

University of Groningen

Insuline en bloedeiwitten

Konijnendijk, W

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1973

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Konijnendijk, W. (1973). *Insuline en bloedeiwitten: Een onderzoek naar insuline-binding aan serumeiwitfracties bij het rund en de mens.* [, Rijksuniversiteit Groningen]. [S.t.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

INSULINE EN BLOEDEIWITTEN

W. Konijnendijk

RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN

INSULINE EN BLOEDEIWITTEN

**EEN ONDERZOEK NAAR INSULINE-BINDING AAN
SERUMEIWITFRACTIES BIJ HET RUND EN DE MENS**

PROEFSCHRIFT

**TER VERKRIJGING VAN HET DOCTORAAT IN DE GENEESKUNDE
AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
DR. A. WATTEL IN HET OPENBAAR TE
VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 9 MEI 1973 DES NAMIDDAGS TE 4 UUR**

DOOR

WILLEM KONIJNENDIJK

geboren te Breda

PROMOTOR: PROF.DR. P.R.BOUMAN

COREFERENTEN: DR. A.M.KROON
DR. W.D.REITSMA

STELLINGEN

I

Bij het analyseren van het effect van fenobarbitalbehandeling op de uitscheiding van stoffen in de gal bij de rat, wordt vaak ten onrechte te weinig rekening gehouden met de zeer complexe werking van fenobarbital op de lever.

II

De opvoedende waarde van de bergsport verdient grotere aandacht.

III

Ernstige reactieve hypoglycaemie kan berusten op een overmatige afgifte van glucagon-achtig immunoreactief materiaal.

IV

Ter bepaling van de diagnose bij stoornissen van psycho-somatische aard moet, gelet op de relationele betrokkenheid op anderen, niet alleen de enkeling maar ook het relevante interactiesysteem in de aandacht worden betrokken.

V

De bewering dat het ontstaan van vacuolen binnen een door röntgenstralen getroffen cel veroorzaakt kan worden door verhoogde vorming van water binnen deze cel moet als zeer onwaarschijnlijk worden beschouwd.

E. Ulrich-Greve - Encyclopedia of Medical Radiology Vol. II, Part 3, p.181.
Ed. O. Hug & A. Zuppinger. Springer Verlag, Berlin 1972.

VI

Bij het gebruik van experimenteel-vetzuchtige ratten en muizen als model bij het onderzoek van adipositas dient men bedacht te zijn op een verschil tussen genetisch en niet-genetisch bepaalde vetzucht.

VII

Het gebruik van gewichtseenheden bij het aangeven van concentraties en gehalten van peptidehormonen is onjuist zolang de referentiepreparaten niet zijn gestandaardiseerd.

*Aan Anna
Voor Talliena*

Een ieder, die op enigerlei wijze heeft bijgedragen tot de totstandkoming van dit proefschrift, betuig ik mijn dank.

Voor een gedeelte van het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd financiële steun ontvangen van de Nederlandse Organisatie voor Zuiver Wetenschappelijk Onderzoek (Z.W.O.).

Dr. D.W.Smits (Rekencentrum der Rijksuniversiteit Groningen) hielp ons met het programmeren van de berekeningen voor de radioimmunologische insulinebepaling.

Dr. J.F.F.Lekkerkerker (Kliniek voor Inwendige Geneeskunde, Academisch Ziekenhuis Groningen) was ons behulpzaam bij het verkrijgen van plasma en serum van adipeuze patienten.

Dr. A.W.Kersjes (Kliniek voor Veterinaire Heelkunde, Rijksuniversiteit Utrecht) verrichtte de operatieve canulering van het pancreas bij een rund voor de verzameling van pancreasvenebloed.

Het runderinsuline was een gift van de N.V. Organon te Oss.

Humane insulinestandaard werd ter beschikking gesteld door Novo Industri A/S te Kopenhagen.

INHOUD

Inleiding	1
Hoofdstuk I: Methoden ter bepaling van insuline in bloed	3
Biologische bepalingsmethoden	3
In vivo methoden	3
In vitro methoden	5
Diafragmamethode	5
Epididymisvet-methode	7
Geïsoleerde vetcellen	8
Immunologische bepalingsmethoden	9
Hoofdstuk II: Onderzoekingen over de transportvorm van insuline in bloed	13
Met antiserum neutraliseerbare en niet-neutraliseerbare activiteit	13
Resultaten verkregen met serumewitfractio- nering	15
Gefractioneerde precipitatie	15
Electroforese	15
Gelfiltratie	16
De "bound insulin" theorie van Antoniades	17
Hoofdstuk III: Kritische beschouwing en probleemstelling	20
Hoofdstuk IV: Methoden	28
Scheidingsmethode	28
Gelfiltratie	28
Biologische bepalingsmethoden	30
Vetweefsel in vitro	30
Diafragma in vitro	32
In vivo methode	33
Radioimmunologische bepalingsmethode	34
Bereiding [¹³¹ I] insuline	34
Bereiding en selectie van antisera	38
Bepalingsmethode	40
Scheiding van vrij en gebonden insuline	43
Opzet van de bepaling	45
Gevoeligheid van de bepaling	46

Hoofdstuk V:	Endogeen insuline in rundersera	47
	Scheiding van exogeen en endogeen insuline van serumeiwitten	47
	Onderzoek van serumeiwitfracties	48
	Serum 51119	53
	Discussie	54
Hoofdstuk VI:	Vorming en dissociatie van een grootmoleculair insulinecomplex	59
	Generatie van een grootmoleculair insulinecomplex	60
	Incubatie van serum en insuline met leverhomogenaat	60
	Immunologische en biologische eigenschappen van het complex	64
	Epididymisvetweefsel in vitro	65
	Diafragma in vitro	65
	Invloed op het glucosemetabolisme in vivo	67
	Complexvorming in afwezigheid van leverhomogenaat en temperatuurafhankelijkheid	69
	Samenvattende beschouwing	72
	Dissociatie van het insulinecomplex	74
	Spontane dissociatie	74
	Invloed van zure pH	77
	Invloed van ureum	78
	Invloed van natriumdodecylsulfaat	80
	Discussie	82
Hoofdstuk VII:	Onderzoekingen met menselijk bloed	86
	Patienten en normale proefpersonen	87
	Methoden	88
	Resultaten	89
	Droge eiwitfracties	89
	Generatie van een grootmoleculair insulinecomplex	95
	Discussie	100
Hoofdstuk VIII:	Slotbeschouwing	104
	Samenvatting	113
	Summary	117
	Literatuur	121
	Lijst van afkortingen	129

INLEIDING

Het hormoon insuline is een eiwit dat zoals alle hormonen slechts in zeer geringe concentraties in het bloed circuleert te midden van een grote hoeveelheid andere eiwitten. In nuchtere toestand bedraagt het langs immunologische weg meetbare insulinegehalte van bloedserum minder dan 10^{-6} mg/ml. De concentratie van de gezamenlijke overige serumeiwitten is daarentegen ongeveer 70 mg/ml. Kwantitatieve bepaling van insuline in plasma of serum is daarom vergelijkbaar met het tellen van spelden in een hooiberg.

In de periode van 1950-1960 zijn biologische bepalingsmethoden voor insuline in bloed ontwikkeld, die berusten op het meten van de biologische activiteit van dit insuline op geïncubeerde weefsels en cellen. Omdat met deze methoden tevens het totaal effect van alle overige stimulerende en remmende substanties op de gekozen parameter wordt gemeten, bepaalt men op deze manier meer de netto insuline-achtige activiteit van het serummonster dan het werkelijke insulinegehalte. Belangrijke verbetering in dit opzicht gaf de sinds 1960 op grote schaal toegepaste immunologische bepalingsmethode. Deze methode is gebaseerd op de herkenning van de voor het insulinemolecuul specifieke eiwitstructuur door middel van tegen dit molecuul gerichte antilichamen, die aan het bepalingssysteem worden toegevoegd.

Spoedig bleek dat immunologische bepalingen van insuline in serum of plasma, lagere uitkomsten gaven dan de biologische bepalingsmethoden. Bovendien werd gevonden dat slechts een deel van de met biologische methoden in serum meetbare insuline-achtige activiteit door toevoeging van tegen insuline gerichte antilichamen geneutraliseerd kon worden. Deze waarnemingen en verdere resultaten verkregen met eiwitfracties uit menselijk en dierlijk serum, hebben met name Antoniades gebracht tot het postuleren van het bestaan van een aan eiwit gebonden vorm van insuline, die niet door de immunologische bepalingsmethoden zou worden gemeten.

Deze conceptie die op onvoldoende experimenteel bewijs steunde, is aanleiding geworden tot een heftige wetenschappelijke controverse tussen Antoniades enerzijds en de ontdekkers van de radioimmunologische bepalingsmethode Yalow en Berson anderzijds. Deze controverse bereikte zijn hoogtepunt in de jaren 1964-1967. In feite werd hierbij een gevecht geleverd over de validiteit van radioimmunologische insulinebepalingen in plasma of serum als zodanig. Dit gevecht lijkt op dit ogenblik in het

voordeel van de immunologische bepalingsmethode te zijn be-slist.

Verschillende tegenstrijdigheden die uit de vele onderzoekin-gen over dit onderwerp naar voren zijn gekomen, zijn echter nimmer opgehelderd. Verder ligt er het feit, dat verschillen-de niet eiwit-achtige hormonen, zoals b.v. cortisol en de schildklierhormonen voor het merendeel aan serumeiwitten ge-bonden circuleren. Deze hormonen zijn in eiwit-gebonden vorm biologisch niet actief en moeten eerst uit hun binding worden vrijgemaakt alvorens zij hun werking kunnen uitoefenen. Van de peptide-hormonen vasopressine en oxytocine is bekend dat een eiwit waaraan ze gebonden kunnen worden, het neurofysine, in het bloed voorkomt. Ook van enkele enzymen is bekend dat zij een complex kunnen vormen met bloedeiwitten, waardoor zij hun biologische activiteit geheel of gedeeltelijk verliezen.

Deze gegevens en de nog steeds onopgehelderde tegenstrijdig-heden zijn de aanleiding geweest tot het in dit proefschrift be-schreven onderzoek naar het voorkomen van een eiwit-gebonden vorm van insuline. In de eerste drie hoofdstukken zullen de verschillende bepalingsmethoden voor insuline in bloed en de literatuur rond het probleem van een gebonden vorm van insu-line besproken worden. Na de beschrijving in Hoofdstuk IV van de door ons gebruikte methodieken, volgen de resultaten van ons eigen onderzoek en de daaraan te verbinden conclusies.

HOOFDSTUK I

METHODEN TER BEPALING VAN INSULINE IN BLOED

Gelijktijdig met de isolering van insuline uit pancreas ontstond de behoefte het hormoon kwantitatief te bepalen. Reeds binnen enkele jaren was het mogelijk met biologische methoden het gehalte van insulinepreparaten met een redelijke betrouwbaarheid te meten. De ontwikkeling van een geschikte methode ter bepaling van insulineconcentraties in plasma of serum stuitte echter op problemen. Na een eerste door Brugsch en Horsters in 1930 beschreven poging, die mislukte doordat zij de convulsieve werking van intraperitoneaal toegediend bloed bij intacte muizen nagingen, een methode die te ongevoelig en achteraf bezien ongeschikt was, duurde het tot omstreeks 1950 voor een enigszins bruikbare methode ter beschikking kwam. De bepaling geschiedde in die tijd alléén op grond van de biologische werking van het hormoon. Toen later meer van de structuur en de immunologische eigenschappen van insuline bekend werd, heeft men getracht op basis hiervan bepalingmethoden op te zetten.

De methoden die in de loop der jaren zijn ontwikkeld en afhankelijk van de vraagstelling gebruikt worden, kunnen onderscheiden worden in twee, principieel van elkaar verschillende typen: de biologische bepalingmethoden en de immunologische bepalingmethoden.

BIOLOGISCHE BEPALINGSMETHODEN

In vivo methoden

Na de isolering van insuline in 1921 (Banting & Best 1922) werden spoedig biologische bepalingmethoden ontwikkeld voor de standaardisering van insulinepreparaten. Bekendheid in dit opzicht verwierven vooral de ijkmethode die gebaseerd was op de bloedsuikerverlagende werking van insuline bij konijnen (Marks 1925) en de gevoeliger muizen-convulsiemethode (Hemmingen & Krogh 1926). Aangezien deze methode echter niet gevoelig genoeg bleken voor het meten van de zeer lage, in het bloed aanwezige insulineconcentraties, werden afzonderlijke bepalingmethoden voor dit doel ontwikkeld.

In 1925 was reeds aangetoond dat dieren door chirurgische verwijdering van de hypofyse gevoeliger worden voor de werking van insuline (Houssay & Magenta 1925). Ook het wegnemen en denerveren van de bijniere bleek een verhoogde gevoeligheid voor het hypoglycaemisch effect van insuline tot gevolg te hebben (Cannon e. m. 1924).

Door ratten te gebruiken waarbij zowel de hypofyse als het bijniermerg waren verwijderd, gelukte het Gellhorn en medewerkers (1941) als eersten insuline in fysiologische concentraties te bepalen. Hoewel het nog niet mogelijk was om insuline in bloed van nuchtere proefpersonen aan te tonen, werd op deze wijze $2\frac{1}{2}$ uur na een maaltijd een gehalte van ongeveer 200 μ E insuline per ml bepaald.

De gevoeligheid van de proefdieren voor insuline kon nog verder worden verhoogd, door naast chirurgische verwijdering van de hypofyse en de bijniere of het bijniermerg tevens het endocriene deel van het pancreas uit te schakelen met behulp van alloxaan (Anderson e. m. 1947, Bornstein 1950). Op deze wijze konden concentraties van 50 μ E insuline per ml worden aangetoond en werd het tevens mogelijk insuline in bloed van nuchtere personen te bepalen (Bornstein & Trehwella 1950). Bornstein wist met behulp van deze methode onderscheid te maken tussen twee verschillende typen van diabetes mellitus. Het ene type kwam voornamelijk voor bij patiënten met overgewicht, bij wie de diabetes op oudere leeftijd was ontstaan. In bloed van deze categorie kon ondanks de diabetes insuline worden aangetoond. Het andere type werd in iedere leeftijdsklasse gevonden, doch hoofdzakelijk bij patiënten die de ziekte reeds op jeugdige leeftijd hadden gekregen. In deze gevallen was geen insuline in het bloed aantoonbaar, terwijl ratten die met plasma van deze patiënten waren behandeld, ongevoelig werden voor een hierop volgende dosis insuline (Bornstein & Lawrence 1951).

Een in vivo methode die gebaseerd is op een geheel andere werking van insuline werd geïntroduceerd door Rafaelsen (1964). Bij deze methode wordt niet het hypoglycaemisch effect, doch de toename van het glycogeen gehalte in het diafragma (middenrif) als parameter voor de insuline-activiteit genomen. Deze methode is later nog verbeterd en uitgebreid. Gelijktijdig met het insuline-bevattende monster wordt een geringe hoeveelheid uniform gemerkt [14 C]glucose intraperitoneaal toegediend aan intacte, jonge manlijke ratten. Enige tijd na de injectie wordt nagegaan hoeveel radioactiviteit geïncorporeerd is in het spierglycogeen en in het glycogeen en vet van het epididymisvetweefsel (Rafaelsen e. m. 1965, Young 1967). Door het effect van een onbekend monster op de incorporatie van radioactivi-

teit te vergelijken met het effect van bekende hoeveelheden insuline kan de insuline-achtige activiteit van het monster worden bepaald.

In vitro methoden

Als gevolg van de beperkte gevoeligheid en de grote onnauwkeurigheid zijn de hierboven beschreven in vivo methoden nimmer op grote schaal toegepast voor de bepaling van insuline in bloed. Ook de ontwikkeling van gevoeliger en minder voorbereiding vergende in vitro methoden heeft hiertoe bijgedragen.

Diafragmamethode

Reeds in 1926 werd bij onderzoekingen naar de stofwisselingsprocessen in geïsoleerd weefsel gebruik gemaakt van het middenrif (diafragma) van de rat (Takane 1926). Daarbij werd gevonden dat de glucoseopname van geïncubeerd spierweefsel onder invloed van insuline toeneemt. Niet alleen de glucoseopname wordt echter door insuline gestimuleerd, doch ook de glycogeensynthese (Gemmill 1941), terwijl er tevens een kwantitatief verband bleek te bestaan tussen de insulineconcentratie in het incubatiemedium en het effect op het glucosemetabolisme (Hechter e.m. 1941, Stadie & Zapp 1947, Krah1 & Park 1948).

Nadat door Tuerkischer en Wertheimer (1948) was waargenomen dat ook normaal serum stimulerend werkt op het glucosemetabolisme van het geïsoleerde rattediafragma, werd door Groen en medewerkers voor het eerst een kwantitatieve bepalingsmethode voor insuline-activiteit in serum volgens dit principe uitgewerkt en toegepast (Kamminga e.m. 1950, Willebrands e.m. 1950). Zij maakten hierbij gebruik van hemi-diafragma's, terwijl de glucoseopname als index voor de insuline-achtige activiteit diende. Het bleek op deze wijze mogelijk de insuline-achtige activiteit in het bloed van nuchtere personen te bepalen (Willebrands e.m. 1951, Groen e.m. 1952). Deze methode is door vele onderzoekers, soms met geringe wijzigingen, overgenomen (Randle 1954, 1956, Vallance-Owen & Hurlock 1954, Wright 1957).

Hoewel Groen en medewerkers (1952) spraken over "insuline-achtige" activiteit, meende men toch dat het stimulerend effect van serum op de glucoseopname voornamelijk door insuline werd veroorzaakt. Het insuline-achtige effect verdween namelijk geheel wanneer dit serum behandeld werd met cysteine of gereduceerd glutathion, stoffen waarvan bekend is dat zij insuline inactiveren (Groen e.m. 1952, Randle 1954, Vallance-

Owen & Hurlock 1954). Bovendien kon in bloed van pancreasloze honden (Groen e.m. 1952) en katten (Vallance-Owen & Lukens 1957), evenals in bloed van patienten met ernstige juvenile diabetes of in diabetisch coma (Groen e.m. 1952, Vallance-Owen e.m. 1955), geen insuline worden aangetoond, terwijl in bloed van patienten met een eilandjestumor hoge spiegels aan insuline-achtige activiteit werden gevonden (Vallance-Owen e.m. 1955, Kelly 1956, Willebrands & Groen 1956). Ook kon het insuline-achtige effect van serum op de glucoseopname met anti-insulineserum geneutraliseerd worden (Wright 1959).

Zowel Groen en medewerkers (1952) als Vallance-Owen en Hurlock (1954) wezen er echter op, dat met de diafragmamethode slechts de effectieve insulineconcentratie wordt gemeten en dat deze niet gelijk behoeft te zijn aan de werkelijk aanwezige hoeveelheid, aangezien men onder deze omstandigheden het totaal-effect van verschillende stoffen meet. Zo is gebleken dat adrenaline en noradrenaline in fysiologische concentraties een remmende invloed hebben op de glucoseopname van het diafragma (Groen e.m. 1958), terwijl leucine in fysiologische concentraties de glucoseopname stimuleert (Castrillon e.m. 1962).

Het is mogelijk met de diafragmamethode insulineconcentraties met een ondergrens van 50-100 μ E/ml te detecteren. Bepalingen van de insuline-activiteit in serum blijken echter sterk uiteenlopende resultaten op te leveren, hetgeen moet worden toegeschreven aan verschillen in experimentele omstandigheden, zoals glucoseconcentratie, incubatieduur, gewicht en oppervlakte van het diafragma, adsorptie van de insuline-standaard aan glas en niet in de laatste plaats het al of niet verdunnen van het te onderzoeken serummonster. Bepalingen in onverdund serum leveren belangrijk lagere activiteiten op dan die in verdund serum, een verschijnsel dat bekend geworden is als het "verduunningseffect". Dit effect is o.m. toegeschreven aan het uitverdunnen van in serum aanwezige insuline-antagonerende substanties. Door Groen en medewerkers (1958) is gewezen op de mogelijke betekenis van adrenaline in dit opzicht. Aan serum toegevoegd insuline wordt echter kwantitatief terugbepaald (Randle 1954, Vallance-Owen & Hurlock 1954).

Problemen zoals bovengenoemd zijn er oorzaak van dat de diafragmamethode nimmer een betrouwbare uitdrukking van de insuline-activiteit van serum op basis van insuline-eenheden heeft opgeleverd. Geen van de vele beschreven modificaties van deze methode blijkt in feite te voldoen aan elementaire eisen die men aan een kwantitatieve biologische bepalingsmethode moet

stellen. Met name aan de absolute voorwaarde van parallelle regressie van het effect van overeenkomende verdunningen van de standaard en het onbekende preparaat (i.c. serum) blijkt vrijwel geen van de bovengenoemde onderzoeken te voldoen. Het merendeel van de bepalingen berust op z.g. drie-punts ijkingen. Als methode voor het kwalitatief aantonen van de aanwezigheid van insuline in bloed heeft de diafragrammethode echter zeer waardevolle informatie opgeleverd en belangrijk bijgedragen tot de thans bestaande inzichten over de betekenis van insuline.

Epididymisvet-methode

Bij in vivo proeven werd gevonden dat insuline ook het glycogeengehalte van vetweefsel doet toenemen (Wertheimer 1945, Fawcett 1948). Tevens bleek er een dosis-werkingsrelatie te bestaan tussen de hoeveelheid toegediend insuline en de glycogeenstapeling (Engel & Scott 1950). Ook in vitro kon een direct effect van insuline op de glucoseopname van vetweefsel worden aangetoond (Krahl 1951). Met name door Renold en medewerkers is veel werk gedaan over de invloed van insuline op de koolhydraatstofwisseling van vetweefsel (Renold e.m. 1950, Renold e.m. 1957, Martin e.m. 1958, Winegrad & Renold 1958). Hieruit werd een gevoelige biologische bepalingsmethode voor insuline en insuline-achtige activiteit van serum ontwikkeld (Martin e.m. 1958, Renold e.m. 1960). Een veel gebruikte parameter bij deze bepalingsmethode is de vorming van $^{14}\text{CO}_2$ uit $[1-^{14}\text{C}]$ glucose (Renold e.m. 1960), doch ook de incorporatie van ^{14}C in glycogeen of vet (Cahill e.m. 1959, Leonards e.m. 1962), de glucoseopname door het vetweefsel (Humbel 1959, Steelman e.m. 1960) of de netto gasuitwisseling (Ball e.m. 1959) worden wel als index voor het insuline-effect genomen.

Ook met deze methode wordt in serum niet alleen insuline, maar de totale insuline-achtige activiteit bepaald. De effecten van eventuele andere stimulerende of remmende stoffen op de gekozen parameter worden immers eveneens gemeten. Hoewel de insuline-achtige activiteit van serum geheel verdween na behandeling met glutathion of cysteïne (Renold e.m. 1960, Leonards e.m. 1962), kon echter slechts 5-30% van de totale meetbare activiteit met anti-insulineserum worden geneutraliseerd (Bürgi e.m. 1962, Leonards e.m. 1962). Ook bleek in bloed van pancreasloze honden nog activiteit aantoonbaar te zijn (Egdahl & Goldberg 1962, Leonards e.m. 1962, Steinke e.m. 1962), hoewel dit immunologisch niet kon worden aangetoond (Egdahl

& Goldberg 1962). Wanneer echter serum van pancreasloze honden, verkregen 5 dagen na de operatie, geëxtraheerd werd met zure alcohol, kon het grootste deel van de in het extract aanwezige activiteit met anti-insulineserum geneutraliseerd worden (Steinke e.m. 1962). Slater en medewerkers (1961) vonden bovendien een opvallende discrepantie, in die zin dat de activiteit die gemeten werd met de $^{14}\text{CO}_2$ -productie niet afnam na verwijdering van het pancreas, terwijl deze activiteit geheel verdween wanneer de ^{14}C -vetsynthese als parameter werd genomen.

Hoewel de epididymisvetmethode gevoeliger is dan de diafragmatechniek en de minimaal detecteerbare insulineconcentratie slechts $10\text{ }\mu\text{E/ml}$ of nog minder bedraagt, kleven ook aan deze methode verschillende van de bezwaren zoals reeds voor de diafragmamethode zijn beschreven. Ook hier blijkt bij bepalingen in serum het onbegrepen verdunningseffect op te treden, alhoewel tussen vier- en twintigvoudige verdunningen de regressie redelijk parallel met die van het insulinestandaardpreparaat verloopt. Het feit dat de in serum voorkomende activiteit slechts gedeeltelijk met antiserum te neutraliseren is en bovendien na pancreatectomie niet op korte termijn verdwijnt, vormt echter een probleem dat nog niet is opgelost.

Een belangrijk voordeel van de epididymisvetmethode boven de diafragmatechniek is ongetwijfeld dat de precisie voor een biologische ijking niet onbevredigend is. Met name de interdiervariatie kan althans binnen één proef grotendeels worden opgeheven, aangezien het mogelijk is uit vetweefsel van verschillende dieren een redelijk homogene weefsel-"pool" te vormen, die over de verschillende incubatievaatjes verdeeld kan worden.

Geïsoleerde vetcellen

In 1964 gelukte het Rodbell vetcellen te isoleren door vetweefsel gedurende enige tijd met collagenase te behandelen. Deze geïsoleerde vetcellen bezaten nog dezelfde metabole eigenschappen als het vetweefsel, terwijl ook de gevoeligheid voor insuline niet was afgenomen. Gliemann (1965, 1967) gebruikte deze geïsoleerde vetcellen voor een zeer gevoelige bepalingsmethode voor insuline-achtige activiteit. De gevoeligheid van deze methode zou ongeveer 10 x groter zijn dan wanneer stukjes vetweefsel worden gebruikt. Doordat de vetcellen afkomstig zijn van het epididymisvet van één dier heeft men geen last van de interdiervariatie en is de spreiding van de uitkomsten geringer dan bij de vorige methoden. Overigens is deze methode

vergelijkbaar met die waarbij stukjes epididymisvet worden gebruikt. Een groot nadeel van de geïsoleerde vetcellen, waardoor deze methode niet algemeen gebruikt wordt, is gelegen in het feit dat het isoleren van de vetcellen een bewerkelijke procedure is die moet gebeuren, kort voordat men met de eigenlijke insulinebepaling kan beginnen.

IMMUNOLOGISCHE BEPALINGSMETHODEN

Reeds in de beginjaren van de klinische toepassing van insuline meende men te mogen concluderen dat dit hormoon antigeene eigenschappen bezit. Caviae die enige weken na een eerste insuline-injectie voor de tweede maal met insuline werden ingespoten, reageerden hierop met anaphylactische shock (Barral & Roux 1931). Omdat alleen een tweede injectie met insuline shock tot gevolg had en een injectie met pancreashomogenaat geen effect vertoonde, werd aangenomen dat insuline en niet een of andere contaminatie van het preparaat het voor de shock verantwoordelijke antigeen was.

Ook met de Schultz-Dale techniek, waarbij uteri van vrouwelijke caviae die door behandeling met insuline waren gesensibiliseerd werden gebruikt, werden de antigeene eigenschappen van insuline aangetoond (Lewis 1937). Tevens werd een sterke kruisreactie met runder- en varkensinsuline gevonden, doch de immunologische eigenschappen van de beide soorten insuline bleken niet volkomen identiek te zijn. Bij konijnen konden complementbindende antilichamen worden opgewekt die volledig kruisreageerden met insuline van verschillende diersoorten (Wasserman e.m. 1940), terwijl sera van een aantal insulineresistente patiënten de convulsieve werking van insuline konden neutraliseren (Banting e.m. 1938, Lowell 1942, 1944, Lerman 1944). De verschillende eigenschappen van de antisera worden veroorzaakt door verschillende antilichamen en kunnen onafhankelijk van elkaar voorkomen bij met insuline behandelde mensen en dieren (Lowell 1942, 1944, Bouman e.m. 1965, Corcos & Ovary 1965, Schuurs e.m. 1965).

Door caviae met een interval van enkele weken te injecteren met een in Freund's adjuvant geëmulgeerde insulineoplossing verkregen Moloney en Coval (1955) antisera met een zeer grote affiniteit voor insuline. De aanwezigheid van antilichamen werd door hen met verschillende immunologische methoden aangetoond. Dat de antilichamen tegen insuline waren gericht en niet waren opgewekt door verontreinigingen in het insulinepreparaat blijkt uit het feit dat uit het antigeen-antilichaamcomplex weer

insuline vrijgemaakt kon worden. Bij konijnen konden door deze auteurs geen insuline-neutraliserende antisera worden opgewekt. Het verschil in reactiviteit tussen het konijn en de cavia wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat bij vele diersoorten, waaronder ook het konijn, de aminozuursamenstelling van het insuline ten opzichte van runderinsuline slechts op de plaatsen 8, 9 en 10 van de A-keten varieert, terwijl bij het insuline van de cavia 18 van de 51 aminozuren afwijken (Smith 1966). Mogelijk is echter ook de tertiaire structuur van het insuline-molecuul van belang voor de antigene werking van het hormoon daar in enkele gevallen met homologe insulines antisera konden worden opgewekt (Lockwood & Prout 1962, Renold e.m. 1964).

Stavitsky en Arquilla (1953, Arquilla & Stavitsky 1956) waren de eersten die insuline met immunologische methoden aantoon- den en kwantitatief bepaalden. Het was met de door hen ge- bruikte methoden, de haemagglutinatie- en de haemolyserem- mingstest, niet mogelijk insuline in bloed te bepalen.

Bij een onderzoek naar het metabolisme van [^{131}I]insuline vonden Berson en medewerkers (1956) dat het radioactieve in- suline bij personen die gedurende enige tijd met insuline waren behandeld, minder snel uit de circulatie verdween dan bij on- behandelde personen. Bij de behandelde personen werd het in- suline aan γ -globuline gebonden, terwijl bij de controleperso- nen geen binding aan dit globuline werd waargenomen. Later is aangetoond dat het hier binding aan immuunglobuline betrof. Bij verder onderzoek van dit insuline-bindende globuline bleek dat de binding van [^{131}I]insuline aan het antilichaam competitief ge- remd werd door de aanwezigheid van niet-gemerkt insuline. De kwantitatieve competitie voor de bindingsplaatsen in het an- tiserum tussen [^{131}I]insuline en niet-gemerkt insuline is de basis van de radioimmunologische bepalingmethode voor insu- line die door deze onderzoekers werd ontwikkeld (Berson & Yalow 1959, Yalow & Berson 1959, 1960).

Bij deze methode laat men enig [^{131}I]insuline reageren met een zodanige hoeveelheid antiserum dat ongeveer 60-70% van het radioactieve hormoon aan antilichamen gebonden wordt. Wanneer aan het reactiemengsel niet-gemerkt insuline wordt toegevoegd zal het percentage gebonden [^{131}I]insuline (B, bound) afnemen, doordat een gedeelte van de bindingsplaatsen door het niet-gemerkte hormoon bezet wordt. Als de concentratie van het niet-gemerkte hormoon toeneemt, zal de hoeveelheid ge- bonden radioactiviteit afnemen en gelijk daarmee de hoeveel- heid vrij [^{131}I]insuline (F, free) stijgen. De B/F-verhouding is dus een maat voor de hoeveelheid toegevoegd insuline. Door de B/F-waarden van enkele bekende hoeveelheden insuline gra-

fisch uit te zetten tegen de insulineconcentratie wordt een standaardlijn verkregen. Het insulinegehalte in een onbekend monster kan nu bepaald worden door de voor het monster gevonden B/F-waarde terug te lezen op deze standaardlijn.

De radioimmunologische bepalingsmethoden voor insuline zijn alle gebaseerd op het hierboven beschreven principe. Zij verschillen voornamelijk in de wijze waarop het vrije insuline en het insuline-antilichaamcomplex van elkaar worden gescheiden. Yalow en Berson maakten aanvankelijk gebruik van papierelectroforese. Door Grodsky en Forsham (1960) werd het insuline-antilichaamcomplex uitgezouten. Het is ook mogelijk om het oplosbare complex te precipiteren volgens de z.g. "two antibody" methode. Hierbij wordt een tweede soort antilichamen, dat gericht is tegen het insuline-bindende antilichaam, aan het medium toegevoegd waardoor een onoplosbaar complex gevormd wordt (Morgan & Lazarow 1962, Hales & Randle 1963). Op nog vele andere manieren is scheiding verkregen tussen het vrije insuline en het insuline-antilichaamcomplex, o.a. door alcoholprecipitatie (Gordis 1960, Heding 1966), m.b.v. ionenwisselaars (Meade & Klitgaard 1962), gelfiltratie over Sephadex (Genuth e.m. 1965), proteolytische afbraak van het vrije insuline (Beck e.m. 1964, Mitchell & Byron 1967), met dextraan gecoate actieve kool (Herbert e.m. 1965), binding vooraf van het antilichaam aan Sephadex (Wide & Porath 1966) of aan een kunststofdrager (Catt e.m. 1967).

De radioimmunologische bepalingsmethoden bezitten naast een goede precisie (Hales & Randle 1963, Morgan & Lazarow 1963) een grote gevoeligheid. Hoeveelheden van minder dan $3 \mu\text{E}$ ($\approx 10^{-10}$ g) insuline per ml plasma kunnen nog betrouwbaar worden bepaald.

Het materiaal dat met de radioimmunologische bepalingsmethoden voor insuline rechtstreeks in plasma of serum aangevoerd kan worden, wordt aangeduid als IRI (Immunologisch Reactief Insuline). De aantoonbaarheid van IRI berust op een specifieke chemische configuratie, zoals deze in het insulinemolecuul voorkomt. De aanwezigheid van deze configuratie behoeft echter niet te betekenen dat het betreffende molecuul ook biologische activiteit bezit. Zo reageert b.v. een insulinemolecuul dat de laatste acht aminozuren van de B-keten mist, nog wel met insuline-antilichamen, terwijl het zijn biologische activiteit verloren heeft (Yalow & Berson 1961). Ook het vrij recent aangetoonde "proinsuline" is immunologisch reactief, maar het molecuul als zodanig zou slechts zeer geringe biologische activiteit bezitten (Steiner e.m. 1968).

Hoewel het antilichaam specifiek gericht is tegen een bepaalde

configuratie in het insulinemolecuul, moet men steeds bedacht zijn op de aanwezigheid van stoffen die de complexvorming kunnen beïnvloeden, waardoor foutieve uitkomsten verkregen worden. Dergelijke factoren, waardoor b.v. de precipitatie van het insuline-antilichaamcomplex met behulp van een tweede antilichaam wordt geremd, zijn in bloed aangetoond (Morgan e.m. 1964).

HOOFDSTUK II

ONDERZOEKINGEN OVER DE TRANSPORTVORM VAN INSULINE IN BLOED

MET ANTISERUM NEUTRALISEERBARE EN NIET-NEUTRALISEERBARE ACTIVITEIT

In tegenstelling tot de insuline-achtige activiteit van serum op diafragmaweefsel die geheel of nagenoeg geheel met antiserum geneutraliseerd kan worden (Taylor & Randle 1959), is de met epididymisvetweefsel gemeten insuline-achtige activiteit (ILA, insulin-like activity) slechts gedeeltelijk met anti-insuline-serum neutraliseerbaar (Leonards 1959).

Op grond hiervan werd door Samaan en medewerkers aangenomen dat insuline in twee verschillende vormen in bloed voorkomt. De ene vorm, "typisch insuline", zou door antiserum geneutraliseerd worden, terwijl de andere vorm, "atypisch insuline", zodanig gemodificeerd zou zijn dat het niet meer met anti-insulineserum kan reageren, doch nog wel biologische activiteit op vetweefsel in vitro uitoefent (Samaan e. m. 1962). Volgens deze onderzoekers zou insuline in de "typische" vorm door het pancreas worden afgegeven en daarna elders in het lichaam, vermoedelijk in de lever, gedeeltelijk in de "atypische" vorm worden omgezet (Samaan e. m. 1962, 1963). Een belangrijk argument dat "atypisch insuline", waarvan de mol. massa groter is dan 30.000, een gemodificeerde vorm van insuline zou kunnen zijn, vonden zij in het feit dat een deel van deze "atypische" activiteit door behandeling met zure alcohol omgezet kon worden in de met antiserum neutraliseerbare vorm (Samaan e. m. 1963a).

Door Froesch en medewerkers (1963) werd de insuline-achtige activiteit van serum op vetweefsel onderscheiden in een "antibody-suppressible" (neutraliseerbare) en een "nonsuppressible" (niet-neutraliseerbare) ILA. Bij een onderzoek naar de fysisch-chemische en biologische eigenschappen van het niet-neutraliseerbare deel van de insuline-achtige activiteit werd gevonden dat de elektroforetische beweeglijkheid ervan overeenkwam met die van de α_2 - β_1 -globulinen en dat de mol. massa 70.000-150.000 bedroeg. Door deze grootmoleculaire, niet-neutraliseerbare ILA te behandelen met 5 M azijnzuur trad er een irreversibele dissociatie van het complex op, waarna de activiteit gebonden was aan moleculen met een mol. massa tussen 6.000 en 10.000 en na elektroforese hoofdzakelijk gevonden werd

in het gebied van de β - γ -globulinen, d.w.z. in de omgeving van de opbrengplaats (Bürgi e.m. 1966). Bij onderzoek van de biologische eigenschappen van dit kleinmoleculaire preparaat in de aanwezigheid van overmaat antiserum ter neutralisering van eventueel aanwezig insuline, kon op geen van de onderzochte parameters enig kwalitatief verschil met de werking van kristallijn insuline worden aangetoond (Froesch e.m. 1966). Froesch en medewerkers waren echter van mening dat de niet-neutraliseerbare activiteit niet veroorzaakt wordt door een gemodificeerde vorm van insuline, aangezien deze activiteit (in tegenstelling tot de waarnemingen van Samaan) steeds op hetzelfde niveau blijft ongeacht de hoogte van de insulinespiegels en zelfs na pancreatetectomie niet verdwijnt. Zij konden in hun preparaten geen insuline aantonen, terwijl het ook niet mogelijk was een deel van de activiteit om te zetten in een met antiserum neutraliseerbare vorm (Froesch e.m. 1967). Dit laatste is echter niet in overeenstemming met de resultaten van anderen die uit serum waarin geen neutraliseerbare activiteit meer aantoonbaar was, met zure alcohol een product konden extraheren waarvan de biologische activiteit gedeeltelijk door anti-insulineserum geremd kon worden (Steinke e.m. 1962, Samaan e.m. 1963a).

Naar aanleiding van de in vivo proeven van Samaan en medewerkers (1963) waarbij doorstroming van de lever met insuline resulteerde in een toename van het "atypische insuline", is door een aantal groepen de afgifte van insuline-achtige activiteit door de geperfundeerde geïsoleerde lever nagegaan. Bürgi en medewerkers (1963, Kopetz e.m. 1966) vonden alleen een snelle inactivering van het insuline, maar geen toename van de niet-neutraliseerbare activiteit. Solomon en medewerkers (1967) zagen na 5-6 uren perfunderen wel een toename van de niet-neutraliseerbare activiteit, die echter gepaard ging met symptomen van leverbeschadiging. Siess en medewerkers (1965) en Gershoff en medewerkers (1970) vermeldten eveneens afgifte van niet-neutraliseerbare activiteit, maar dit werd ook waargenomen indien het perfusiemedium geen insuline bevatte. Door Siess en medewerkers is dit toegeschreven aan een hepatische oorsprong van dit materiaal zonder dat insuline hierbij een rol zou spelen, terwijl Gershoff en medewerkers op grond van het gelijk blijven van de totale biologische activiteit in het geval dat er wel insuline aanwezig was, meenden dat er sprake was van omzetting van insuline in een andere vorm.

Gefractioneerde precipitatie

Met een in vivo methode waarbij gebruik gemaakt werd van hypofyseloze, alloxaan-diabetische ratten kon in normaal menselijk plasma geen insuline-achtige activiteit aangetoond worden. Dit was echter wel mogelijk in een globuline-bevattend precipitaat van ditzelfde plasma (Goetz e.m. 1954, Beigelman e.m. 1956). Werden de plasma-eiwitten gefractioneerd met behulp van koude ethanol (Cohn e.m. 1946, Lever e.m. 1951), dan werd de meeste biologische activiteit gevonden in de fractie I + III die o.a. α_2 - en β -globulinen en lipoproteinen bevatte (Beigelman e.m. 1956, Vargas e.m. 1960). De fractie IV + V + VI bleek als zodanig niet biologisch actief te zijn, doch na elektroforetische subfractionering van dit materiaal kon in het albumine- α_1 -globulinegebied insuline-achtige activiteit aangetoond worden, waarschijnlijk doordat een stof die de glucoseopname door het diafragma remt van de actieve fractie gescheiden werd (Vargas e.m. 1960).

Electroforese

Werd serum elektroforetisch gefractioneerd en de verdeling van de ILA in de verschillende fracties nagegaan, dan werd steeds activiteit gevonden in het β - γ -globulinegebied (Randle & Taylor 1958, Beigelman & Onoprienko 1959, Bolinger e.m. 1959, Gundersen & Williams 1960, Lyngsøe 1963, Ditschuneit e.m. 1964, Gliemann 1965, Poffenbarger e.m. 1968). Soms was ook activiteit aantoonbaar in het albumine- α_1 -globulinegebied (Randle & Taylor 1958, Gundersen & Williams 1960, Lyngsøe 1963, Ditschuneit e.m. 1964). Men meende dat de activiteit in dit laatste gebied, althans gedeeltelijk, veroorzaakt werd door vrij insuline, daar in controleexperimenten waarbij insuline aan het te scheiden serum was toegevoegd, dit insuline in het albumine- α_1 -globulinegebied werd teruggevonden (Randle & Taylor 1958, Gliemann 1965). De activiteit in het β - γ -gebied zou veroorzaakt worden door een gebonden vorm van insuline en niet een gevolg zijn van een α -specifiek effect van het preparaat, daar de activiteit geheel of gedeeltelijk met anti-insulineserum geneutraliseerd kon worden (Randle & Taylor 1958, Lyngsøe 1963, Ditschuneit e.m. 1964).

Men heeft ook getracht een eventuele binding van insuline aan serumeiwitten na te gaan door radioactief insuline zowel in vivo als in vitro toe te dienen en de verdeling van de radioacti-

viteit in de verschillende eiwitcomponenten van het serum te bepalen. Met behulp van immunoelectroforese werd aangetoond dat de meeste radioactiviteit aan het α_2 -macroglobuline werd gebonden (Clausen e.m. 1963, Zahnd & Scheidegger 1963, Geerling & Sirek 1965). Uit de waarneming dat de binding aan het α_2 -macroglobuline reversibel was wanneer anti-insulineserum werd toegevoegd volgt dat de gemeten radioactiviteit afkomstig was van gebonden immunologisch intact insuline (Zahnd & Scheidegger 1963). Soms werd ook enige radioactiviteit in andere componenten, b.v. het α_1 -globuline, aangetoond (Prout e.m. 1963, Zahnd & Scheidegger 1963, Geerling & Sirek 1965).

Gelfiltratie

Door middel van gelfiltratie over Sephadex G-50 of G-75 kan het in serum aanwezige insuline gescheiden worden van de serum-eiwitten. Zowel in het eiwit- als het insulinegebied kon insuline-achtige activiteit worden aangetoond waarbij het eiwitgebied de meeste activiteit bevatte (Gliemann 1965, Steinke & Soeldner 1965). Immunologisch konden zeer geringe hoeveelheden IRI in het eiwitgebied worden bepaald (Steinke & Soeldner 1965, Kajinuma e.m. 1969). Met Sephadex G-100 werd niet alleen insuline van de serum-eiwitten gescheiden, maar werden tevens de eiwitten in twee fracties verdeeld. De insuline-achtige activiteit bleek nu voornamelijk in de tweede eiwitpiek gelocaliseerd te zijn en wel in het dalende gedeelte hiervan (Antoniades e.m. 1965, Poffenbarger e.m. 1968).

Wanneer serum, waaraan radioactief-gemerkt insuline was toegevoegd, gescheiden werd met behulp van Sephadex G-200, werden de serum-eiwitten in drie fracties verdeeld. Radioactiviteit was meetbaar in de eerste en de derde eiwitpiek en tevens op de plaats waar vrij insuline verwacht kon worden. De radioactiviteit in de eerste piek bleek voornamelijk gebonden te zijn aan het α_2 -macroglobuline en in geringere mate aan het β_2 -macroglobuline, terwijl zij in de derde eiwitpiek aan een α_1 -globuline gebonden was. Een deel van de in de eiwitpieken gebonden radioactiviteit kon met een immunoprecipitatie-methode voor insuline worden neergeslagen en gedroeg zich dus nog als immunologisch intact insuline (Gjedde 1967). Insuline-achtige activiteit werd aangetoond in de drie gebieden waar ook de radioactiviteit geconcentreerd was. De insuline-achtige activiteit in de eiwitfracties bleek van het niet-neutraliseerbare type te zijn, doch na dialyse van deze fracties tegen water werd een sterke toename van de biologische activiteit waargenomen die tevens voor een groot deel met antiserum geneutraliseerd kon worden (Gjedde

1968). Bürgi en medewerkers (1966) vonden de niet-neutraliseerbare activiteit verspreid over een breed gebied met een maximum tussen de tweede en de derde eiwitpiek.

Werd een zuur alcohol-extract van plasma over Sephadex G-200 gechromatografeerd dan werden slechts twee eiwitpieken verkregen. De eerste piek bevatte materiaal met een mol. massa van 300.000-1.000.000, terwijl de tweede piek samenviel met de plaats waar anders albumine wordt geëluëerd. In het gehele gebied van het eluaat kon insuline-achtige activiteit worden aangetoond die niet met antiserum geneutraliseerd kon worden. Alle fracties bevatten echter radioimmunologisch bepaalbaar insuline, waarbij de meeste activiteit in de eerste eiwitpiek werd gevonden (Cameron e.m. 1966). Deze auteurs gaan niet in op het feit dat de biologische activiteit niet met anti-insulineserum geneutraliseerd kon worden, terwijl er wel immunologisch reactief materiaal werd aangetoond. Zij meenden dat de in de eiwitfracties bepaalde activiteit veroorzaakt werd door aan eiwit (albumine) gebonden insuline.

Wanneer serum over Sephadex G-50 gefractioneerd werd en de fracties afzonderlijk radioimmunologisch bepaald, kon tussen het eiwit- en het insulinegebied ook nog activiteit worden aangetoond (Roth e.m. 1968). Hoewel het nog niet met specifieke antisera is aangetoond, wordt algemeen aangenomen dat dit "big insulin", dat een mol. massa heeft van ongeveer 10.000, geen insulinecomplex is, doch identiek is aan proinsuline. Dit voorstadium bij de biosynthese van insuline wordt naast insuline in geringe hoeveelheden door het pancreas afgegeven.

DE "BOUND INSULIN" THEORIE VAN ANTONIADES

In 1956 werd door Beigelman en medewerkers waargenomen dat bepaalde, uit citraat-plasma verkregen eiwitfracties wel insuline-achtige activiteit bezaten, terwijl geen activiteit werd gevonden in overeenkomstige fracties die verkregen waren uit plasma dat bereid was uit bloed dat een kationenwisselaar was gepasseerd om het onstolbaar te maken. Dit was voor deze groep onderzoekers aanleiding om na te gaan of er activiteit op de hars was achtergebleven. Door de hars te behandelen met citroenzuur kon 40-80% van de oorspronkelijk in het plasma aanwezige activiteit van de hars geëluëerd worden (Antonides e.m. 1958). De geëluëerde activiteit was alleen aan te tonen met de epididymisvet-methode en bleek geen invloed te hebben op de glucoseopname van het geïsoleerde diafragma. Uitgaande van de gedachte dat het verschil in effect veroorzaakt

zou kunnen zijn door een stof die aanwezig is in vetweefsel en niet in spierweefsel en die het aanvankelijk niet-actieve materiaal kan omzetten in een actieve vorm, werd het eluaat behandeld met een vetextract waarna inderdaad ook op het diafragma insuline-achtige activiteit gevonden werd (Antoniades & Gundersen 1961).

Op grond van deze waarnemingen postuleerden Antoniades en medewerkers dat insuline in twee vormen in bloed zou circuleren, nl. als vrij insuline en in een gebonden vorm. "Vrij" insuline kan met biologische bepalingsmethoden rechtstreeks gemeten worden, de activiteit ervan is met antiserum te neutraliseren en evenals gezuiverd insuline hecht het zich niet aan een kationenwisselaar. "Gebonden insuline" zou gemakkelijk uit bloed geïsoleerd kunnen worden met behulp van een kationenwisselaar waarvan het met verdund zuur of base geëluëerd zou kunnen worden. Het complex als zodanig zou alleen actief zijn op vetweefsel en niet op spierweefsel. Eerst na behandeling van het complex met vetextract zou biologische activiteit op diafragmaweefsel optreden.

Bij nuchtere mensen en dieren is volgens Antoniades insuline voornamelijk in de gebonden vorm in de circulatie aanwezig. Na glucosebelasting werd een stijging van de concentratie van het vrije insuline in het bloed beschreven en bleek de hoeveelheid "gebonden insuline" sterk af te nemen (Antoniades e.m. 1962, Gozariu e.m. 1966). De auteurs meenden dat de toename van het vrije insuline voor een deel veroorzaakt werd door dissociatie van het circulerend insulinecomplex.

Dat de activiteit van "gebonden insuline" niet alleen een in vitro effect zou zijn, maar mogelijk ook in vivo een rol zou kunnen spelen wordt gesuggereerd door de waarnemingen dat intraperitoneale toediening van het complex bij ratten de incorporatie van [^{14}C]glucose in vet- en diafragmaweefsel deed toenemen (Antoniades e.m. 1965a), terwijl een intraveneuze toediening van het materiaal bij ratten (Antoniades & Gershoff 1966) en bij apen (Ensinck e.m. 1967) hypoglycaemie tot gevolg had.

Ook van vetextract werd een in vivo effect beschreven. Werd vetextract toegediend aan bijnierloze ratten die gevoelig zijn voor kleine hoeveelheden insuline, dan trad een daling van het bloedsuikergehalte op en stierven vele dieren tengevolge van een ernstige hypoglycaemie. Dit zou gepaard gaan met een afname van de hoeveelheid circulerend "gebonden insuline" (Lenti e.m. 1968, Antoniades 1969).

Hoewel het nimmer gelukt is met radioimmunologische bepalingsmethoden in het eluaat (na dissociatie van het complex

met behulp van vetextract) insuline aan te tonen, werd door Antoniades en enkele andere onderzoekers gerapporteerd dat een gedeelte van de activiteit op het diafragma met anti-insulineserum geneutraliseerd kon worden (Antoniades 1961, 1963, Shaw & Shuey 1963, Gundersen & Lin 1965). Ook na extractie van "gebonden insuline" met zure alcohol bleek het preparaat actief te zijn op spierweefsel en was een gedeelte van de ge-extraheerde activiteit met antiserum te neutraliseren, hoewel radioimmunologisch geen insuline aangetoond kon worden (Antoniades e.m. 1965). Werde de activiteit van "gebonden insuline" in vivo bepaald, dan kon deze activiteit eveneens gedeeltelijk geneutraliseerd worden (Stern e.m. 1969, Antoniades & Simon 1972).

Ook is gesteld dat het antidiabeticum tolbutamide in vivo niet alleen de insulinesecretie bevordert, maar dat de toename van het vrije insuline tevens gepaard zou gaan met een afname van het "gebonden insuline". Dit laatste zou een gevolg zijn van een verhoogde utilisatie van het complex door het weefsel of van dissociatie van het insulinecomplex (Antoniades e.m. 1963).

Reeds hier dient er echter op gewezen te worden dat vele onderzoekers van mening zijn dat de door Antoniades gelanceerde conceptie van "bound insulin" onvoldoende door zijn experimentele gegevens ondersteund wordt om het gebruik van de term "bound insulin" te rechtvaardigen. Bovendien zijn vele onderzoekers er niet in geslaagd de waarnemingen van Antoniades te bevestigen. Het is dan ook niet verwonderlijk dat "bound insulin" het domein is geworden van een heftige wetenschappelijke controverse, te meer omdat deze theorie een rechtstreekse aantasting betekende van de validiteit van de radioimmunologische insulinebepaling. In het volgende hoofdstuk zal op deze aspecten nader worden ingegaan.

HOOFDSTUK III

KRITISCHE BESCHOUWING EN PROBLEEMSTELLING

Hoewel ook anderen het bestaan van een insulinecomplex hebben gesuggereerd, is juist het "gebonden insuline" zoals dit door Antoniades en medewerkers (1962) gepostuleerd werd onderwerp geweest van zeer veel kritiek (Berson & Yalow 1964, Kipnis & Stein 1964, Gener-Segui & Wolfe 1966, Yalow & Berson 1967, Meade e.m. 1968). Berson & Yalow (1964) meenden dat de door Antoniades beschreven waarnemingen op een artefact berusten en een gevolg zijn van geringe gevoeligheid en a-specificiteit van de biologische bepalingsmethoden. Daarnaast hebben deze onderzoekers een reeks van meer zakelijke argumenten tegen het bestaan van een gebonden vorm van insuline naar voren gebracht en op verschillende tegenstrijdigheden in de experimentele gegevens van Antoniades gewezen. Dit alles neemt niet weg dat, hoewel het bestaan van een gebonden vorm van insuline tot dusver niet onomstotelijk is aangetoond, het tegendeel evenmin is bewezen. Teneinde dit te verduidelijken zijn de volgende argumenten pro en contra van belang.

Het meest centrale en het moeilijkst te weerleggen bezwaar tegen het bestaan van het "gebonden insuline" van Antoniades is het feit dat bij dissociatie van het complex door middel van vetextract, vrij insuline zou moeten ontstaan. Dit zou met radioimmunologische methoden moeten kunnen worden aangetoond. Alle door verschillende onderzoekers ondernomen pogingen hiertoe, waaronder die van Antoniades zelf, hebben echter slechts negatieve resultaten opgeleverd (Antoniades 1961, Berson & Yalow 1961, Soeldner aangehaald door Antoniades e.m. 1965, Stern e.m. 1969). Aan de andere kant laat dit zich moeilijk rijmen met het feit dat de versterkte insuline-achtige werking op diafragmaweefsel van met vetextract behandeld serum, wel met anti-insulineserum onderdrukt kan worden, een verschijnsel dat door verschillende onderzoekers is waargenomen (Antoniades 1963, Shaw & Shuey 1963, Gundersen & Lin 1965, Stern e.m. 1969).

Terecht wijzen Berson & Yalow (1964) op de experimentele resultaten van Antoniades en medewerkers (1962) dat de totale in het plasma aantoonbare insuline-achtige activiteit ("vrij" + "gebonden" insuline) 20-30 minuten na een intraveneuze gluco-

sebelasting afneemt. Algemeen wordt echter zowel met de epididymisvetmethode als met de diafragmamethode een toename van de insuline-achtige activiteit gevonden.

Yalow & Berson (1967) bepaalden met de radioimmunologische methode het insulinegehalte in fracties die verkregen waren met behulp van elektroforese van plasma. De afwezigheid van immunologisch reactief materiaal in de eiwitfracties gebruikten zij als argument tegen het voorkomen van een gebonden vorm van insuline. Zij gaan er hierbij van uit dat het eventueel in een gebonden vorm aanwezige insuline met de radioimmunologische methode aangetoond zou kunnen worden. Dit is echter op grond van de gedeeltelijke biologische werkzaamheid en de slechte neutraliseerbaarheid van het "gebonden insuline" niet te verwachten en mag dan ook niet als argument tegen het bestaan van een dergelijk complex worden aangevoerd.

Op grond van het feit dat na chirurgische verwijdering van het pancreas slechts een gedeeltelijke afname van de insuline-achtige activiteit werd waargenomen (Leonards 1959, Egdahl & Goldberg 1962, Steinke e.m. 1962, Schoeffling e.m. 1965, Ide e.m. 1969), terwijl de immunologisch bepaalbare activiteit wel geheel verdwijnt (Egdahl & Goldberg 1962, Schoeffling e.m. 1965, Ide e.m. 1969), menen vele onderzoekers dat de epididymisvetmethode niet specifiek is en dus ongeschikt om insuline in bloed te bepalen. De na pancreatectomie nog dagenlang resterende activiteit kan volgens vele onderzoekers moeilijk veroorzaakt worden door insuline, althans niet wanneer het pancreas geheel verwijderd is en er geen insuline meer aan de bloedbaan wordt afgegeven. Het is echter mogelijk gebleken uit serum van pancreasloze dieren, dat als zodanig geen neutraliseerbare activiteit bevatte, materiaal te extraheren waarvan de activiteit met anti-insulineserum neutraliseerbaar was (Steinke e.m. 1962, Schoeffling e.m. 1965). Dit zou kunnen betekenen dat er in bloed een zekere hoeveelheid insuline circuleert in een vorm die als zodanig niet met antilichamen kan reageren en die mogelijk biologisch minder actief is dan vrij insuline, aangezien de dieren enige tijd na pancreatectomie sterven tengevolge van een ernstige keto-acidose. Dat deze activiteit geruime tijd na het verwijderen van het pancreas aanwezig blijft zou misschien kunnen worden toegeschreven aan een lange halfwaarde-tijd van een eventueel insulinecomplex. Aan de andere kant moet echter ook gedacht worden aan de mogelijke aanwezigheid van ectopisch pancreasweefsel (Barron 1959). Ook door anderen is aangetoond dat althans een gedeelte van de biologische activiteit die niet door antilichamengeneutraliseerd wordt, door behandeling met zure alcohol kan worden omgezet in een wel met antiserum neu-

traliseerbare vorm (Moloney 1962, Samaan e.m. 1963a). Dat de insuline-achtige activiteit, die na pancreatectomie nog in serum aantoonbaar blijft, misschien fysiologische betekenis heeft zou kunnen volgen uit de waarneming dat ook bij honden waarbij 5-6 dagen tevoren het pancreas was verwijderd de insuline-achtige activiteit na glucosebelasting toenam (Egdahl & Goldberg 1962).

Tegenover de door anderen geopperde mogelijkheid dat althans een deel van de niet-neutraliseerbare activiteit door insuline wordt veroorzaakt, staat de mening van Froesch en medewerkers dat het niet-neutraliseerbare deel van de insuline-achtige activiteit volledig een gevolg is van de a-specificiteit van de bepalingsmethode en niets met insuline te maken heeft. Tegen de conclusies van deze groep onderzoekers zijn toch wel enige bedenkingen aan te voeren. Zo vonden zij in een tussenproduct dat verkregen was bij de zuivering van de niet-neutraliseerbare activiteit, geringe hoeveelheden neutraliseerbaar materiaal. In 14 preparaten werd een gemiddelde niet-neutraliseerbare activiteit van $52 \mu\text{E}/\text{mg}$ bepaald, terwijl in de helft van de preparaten neutraliseerbare activiteit kon worden aangetoond met een gemiddelde waarde van $17 \mu\text{E}/\text{mg}$. Bij verdere zuivering waarbij de "recovery" aan niet-neutraliseerbare activiteit ongeveer 100% was, verkregen zij een product met een niet-neutraliseerbare activiteit van $1775 \mu\text{E}/\text{mg}$ en een neutraliseerbare activiteit van $900 \mu\text{E}/\text{mg}$ (Bürgi e.m. 1966). Zij leverden geen commentaar op het feit dat een groot deel van de totale biologische activiteit van het preparaat met anti-insulineserum geneutraliseerd kon worden, terwijl tevens de toename aan neutraliseerbare activiteit per mg relatief groter was dan de toename aan niet-neutraliseerbare activiteit. Om na te gaan of de niet-neutraliseerbare activiteit mogelijk toch door een of andere vorm van insuline veroorzaakt zou kunnen zijn hebben zij hun materiaal geoxideerd met permierenzuur waardoor eventueel aanwezig insuline in A- en B-keten gesplitst wordt. Na electroforetische scheiding van 0,5 mg van het behandelde materiaal konden geen A- en B-ketens worden aangetoond (Bürgi e.m. 1966, Froesch e.m. 1967). Deze waarneming mag echter niet, zoals door genoemde onderzoekers is gedaan, als argument tegen de aanwezigheid van insuline in hun preparaat gebruikt worden daar de hoeveelheid materiaal te gering was om, zelfs wanneer alle activiteit door insuline veroorzaakt zou zijn, de afzonderlijke ketens te kunnen detecteren (minder dan 20 ng A- of B-keten). In later werk werd aangetoond dat er minstens twee soorten niet-neutraliseerbare activiteit voorkomen en dat met de door hen gebruikte methode

minder dan 5% van de in serum aanwezige niet-neutraliseerbare activiteit geëxtraheerd wordt. Om deze redenen zijn de verkregen resultaten niet representatief voor de totale niet-neutraliseerbare activiteit doch slechts voor een gering deel hiervan (Jakob e.m. 1968).

Zeer recent werd door Hall (1972) beschreven dat somatomedine ("sulfation factor") uit plasmaeiwitfracties verkregen kan worden volgens de methode die Jakob en medewerkers (1968) gebruikten voor de zuivering van een fractie met niet-neutraliseerbare insuline-achtige activiteit. Bij de zuivering, waarbij o.a. gebruik gemaakt werd van de kationenwisselaar Dowex 50 volgens de methode van Antoniades, werd gevonden dat de insuline-achtige activiteit per mg eiwit in dezelfde mate toenam als de somatomedineactiviteit. Dit zou kunnen betekenen dat somatomedine één van de factoren is waardoor een deel van de niet-neutraliseerbare insuline-achtige activiteit in bloed veroorzaakt wordt en tevens dat het aanwezig is in het materiaal dat door Antoniades is aangeduid als "bound insulin". Behalve op de glucosestofwisseling heeft somatomedine ook een insuline-achtig effect op de leucine incorporatie door spierweefsel (Salmon & DuVall 1970) en remt het de door adrenaline gestimuleerde lipolyse van vetweefsel (Underwood e.m. 1972).

Ook de pogingen die gedaan zijn om met behulp van toegevoegd insuline een mogelijke binding van insuline aan serumeiwitten aan te tonen, leveren onvoldoende argumenten vóór of tegen het bestaan van een gebonden vorm van insuline. In de gevallen waarbij radioactief insuline werd gebruikt om eventuele binding van insuline te onderzoeken, werd bij voorbaat aangenomen dat radioactief insuline zich in het testsysteem identiek gedraagt als niet-gejodeerd insuline. Hiervan mag men echter niet zonder meer uitgaan, daar in ieder geval één van de vier in het insuline aanwezige tyrosines een joodatoom bevat, d. w. z. dat aan de benzeenring van dit aminozuur een atoom gehecht is dat ongeveer even groot is als de benzeenring zelf. Het is daarom niet uitgesloten dat een eventuele binding van insuline aan eiwit door het joodatoom in positieve of negatieve zin beïnvloed wordt. Bovendien is het niet bekend in hoeverre er tijdens het experiment "beschadiging" van het radioactieve molecuul optreedt en welke gevolgen dit heeft voor het resultaat.

Hoewel niet alle beschadigd [^{131}I]insuline aan serumeiwitten gebonden wordt, is volgens Berson en Yalow (1964) wel alle eiwit-gebonden radioactiviteit afkomstig van beschadigd insuline. Zij menen dat beschadigd insuline dat aan eiwit gebonden is niet meer met antilichamen kan reageren. Hiertegenover staan echter de waarnemingen van anderen, die vonden dat bij toe-

voeging van antiserum geen binding van radioactiviteit aan α -globuline optrad (Prout e.m. 1963), of dat zelfs de hoeveelheid reeds gebonden radioactiviteit afnam (Zahnd & Scheidegger 1963). Gjedde (1967) heeft waargenomen dat een deel van de aan eiwit gebonden radioactiviteit met een voor insuline specifieke immunoprecipitatie met behulp van een z.g. "second antibody" kon worden neergeslagen. In niet gepubliceerde experimenten hebben ook wij gevonden dat een gedeelte van de gebonden radioactiviteit nog met anti-insulineserum kan reageren. De bewering dat de gebonden radioactiviteit uitsluitend door beschadigd, niet meer immuno-reactief insuline veroorzaakt wordt is dus niet juist. Dit heeft echter evenmin te betekenen dat de binding van radioactiviteit een maat voor de binding van niet-gemerkt insuline aan serumeiwitten zou zijn. Toevoeging van relatief grote hoeveelheden kristallijn insuline heeft volgens sommige onderzoekers weinig of geen invloed op de binding van radioactiviteit, er is dus geen competitie voor dezelfde bindingsplaatsen tussen kristallijn en radioactief insuline (Berson & Yalow 1964, Merimee e.m. 1965). Dit is echter niet in overeenstemming met de resultaten van Gjedde (1967). Mogelijk zijn betrekkelijk geringe experimentele verschillen reeds van invloed op de hoeveelheid en de eigenschappen van de gebonden radioactiviteit.

Uit de resultaten die verkregen zijn met behulp van de ultracentrifuge zou blijken dat endogeen of toegevoegd radioactief insuline niet aan serumeiwitten gebonden is of gebonden kan worden (Berson & Yalow 1962, Kipnis & Stein 1964, Chao e.m. 1965). Steeds werd gevonden dat een gedeelte van de toegevoegde radioactiviteit of de immunologisch detecteerbare endogene activiteit sedimenteert, terwijl ongeveer 60-80% van de oorspronkelijk in het plasma of serum aanwezige activiteit na centrifugeren in de bovenste lagen achter bleef. Door Chao en medewerkers werden overeenkomstige waarden gevonden wanneer radioactief insuline werd toegevoegd aan een fysiologische zoutoplossing, zodat volgens deze onderzoekers het verdwijnen van activiteit uit de bovenlaag veroorzaakt werd door sedimentatie van vrij insuline en niet een gevolg is van het precipiteren van een grootmoleculair complex. Als men na centrifugeren van plasma een afname van IRI in het supernatant vindt die overeenkomt met de afname van de radioactiviteit in deze laag bij controle-experimenten, is dit onvoldoende bewijs om het bestaan van een gebonden vorm van insuline te mogen uitsluiten. Men gaat er dan nl. van uit dat een eventueel insulinecomplex met de radioimmunologische methode bepaald kan worden. Dit heeft echter niet zo te zijn en is zelfs niet waarschijnlijk gezien het feit dat in de literatuur, in die gevallen waar een insulinecom-

plex gesuggereerd wordt, onderdrukking van de biologische activiteit met anti-insulineserum alleen mogelijk was na bijzondere behandeling van het materiaal. Sedimentatie van een eventueel insulinecomplex zal dan op deze wijze niet gemeten kunnen worden. Ook de resultaten waarbij gebruik gemaakt werd van radioactief insuline mogen niet als bewijs tegen een insulinecomplex gebruikt worden. Men mag niet zonder meer aannemen dat radioactief insuline zich identiek zal gedragen als endogeen insuline, er zijn op het ogenblik zelfs aanwijzingen dat het tegendeel het geval is. Maar zelfs wanneer dit wel zo mocht zijn, is het nog de vraag of op deze wijze onderscheid gemaakt kan worden tussen wél of géén complexvorming in normaal plasma of serum. De eventueel aanwezige bindingsplaatsen voor insuline zullen reeds bezet zijn (er is immers nog vrij insuline aanwezig), zodat binding van radioactief insuline slechts kan plaatsvinden door uitwisseling met gebonden endogeen insuline. Dit is misschien wel mogelijk, maar het is niet waarschijnlijk dat dissociatie in hoge mate plaats heeft en daarnaast zal er competitie tussen vrij en radioactief insuline voor de vrijgekomen bindingsplaats optreden, zodat slechts weinig radioactiviteit gebonden zal worden. Bij een afname van 20-40% van het vrije radioactieve insuline uit de bovenlaag zal het moeilijk zijn een geringe toename van de sedimenterende activiteit significant te bepalen. Bovendien is het mogelijk dat een complex met een geringere sedimentatiesnelheid dan albumine gevormd wordt, zodat het complex minder snel uit de bovenlaag verdwijnt dan verwacht zou worden.

Een opvallend en nog niet verklaard verschijnsel is gelegen in het feit dat de totale insuline-achtige activiteit in alle fracties tezamen zowel na electroforetische scheiding als na gelfiltratie hoger is dan die van het uitgangsmateriaal (Gundersen & Williams 1960, Steinke e.m. 1962, Lyngsøe 1963, Ditschuneit e.m. 1964, Bärge e.m. 1966, Gjedde 1968). Werden de fracties bovendien nog gedialyseerd, dan werd nog een extra toename van de activiteit gevonden die bovendien voor een deel met anti-insulineserum geneutraliseerd kon worden (Lyngsøe 1963, Gjedde 1968). Een mogelijke oorzaak hiervoor zou kunnen zijn dat door de fractionering en de eventueel er op volgende dialyse een insuline-antagonist van het actieve materiaal werd gescheiden waardoor de activiteit nu volledig bepaald kon worden. Ook zou het mogelijk kunnen zijn dat er aanvankelijk insuline in een niet-actieve vorm aanwezig was, die dan door de bewerking vrijkomt en daardoor bepaald kan worden. Voor deze laatste mogelijkheid pleit tevens het feit dat de door dialyse vrijgemaakte activiteit voor een deel met antiserum geneutraliseerd kon

worden, terwijl dit vóór de dialyse niet het geval was.

Uit de voorgaande kritische beschouwing van de literatuur blijkt dat het probleem van het wel of niet bestaan van een eiwitgebonden vorm van insuline in bloed nog niet is opgelost. Anders gezegd: de van verschillende zijden aangevoerde tegenargumenten zijn hoogstens voldoende om de oorspronkelijk door Antoniades gelanceerde theorie als onbewezen te kwalificeren, mede op grond van gerechtvaardigde twijfel aan de conclusies die deze onderzoeker aan zijn experimentele bevindingen heeft verbonden. Dit houdt echter evenmin in dat de opvatting dat insuline uitsluitend in vrije, ongebonden vorm circuleert, daarmee als bewezen mag worden aangenomen.

Aangezien deze controversionele materie in essentie te herleiden is tot een vraagstelling met betrekking tot de moleculaire grootte van circulerend insuline, hebben wij ons tot doel gesteld juist dit aspect kritisch te toetsen. Als middel hiertoe werd gelfiltratie over Sephadex gekozen, een methode waarmee de in serum aanwezige eiwitten op basis van hun moleculaire grootte snel van elkaar gescheiden kunnen worden.

Uit de aard van de vraagstelling volgt tevens dat het te gebruiken scheidend systeem bij voorbaat aan de noodzakelijke voorwaarde moet voldoen, dat op deze wijze endogeen, niet-eiwitgebonden insuline op grond van zijn geringe moleculaire grootte inderdaad van de serumeiwitten gescheiden kan worden. Dit diende eerst te worden bevestigd alvorens tot onderzoek van eiwitfracties op de mogelijke aanwezigheid van insuline kon worden overgegaan.

Een tweede minstens even essentieel beslissingspunt was het formuleren van criteria, waaraan eventueel in de eiwitfracties aan te treffen of hieruit vrij te maken materiaal zou moeten voldoen teneinde dit als insuline te kunnen bestempelen. Hiertoe werden de volgende criteria gekozen:

1. Een dergelijk materiaal dient detecteerbaar te zijn met voor insuline specifieke radioimmunologische bepalingsmethoden. Dit houdt in dat het materiaal een voor het insulinemolecuul kenmerkende structurele conformatie dient te bezitten.
2. Een dergelijk materiaal dient een dosis-afhankelijke biologische werking te bezitten, welke overeenkomt met die van kristallijn insuline. Bovendien moet deze biologische activiteit kwantificeerbaar zijn in termen van insuline-eenheden. Dit vereist dat de dosis-werkingsrelaties van het materiaal en van kristallijn insuline gekenmerkt zijn door een z.g. "parallel-line response". Het voldoen aan dit criterium is noodzakelijk voor het vaststellen van overeenkomst in biologische werking (activiteit).

3. De biologische werking van een dergelijk materiaal dient onderdrukt te kunnen worden door de aanwezigheid van tegen insuline gerichte antilichamen in het biologische bepalingssysteem. Het voldoen aan dit criterium slaat een noodzakelijke brug tussen de beide voorgaande criteria, aangezien op deze wijze wordt aangetoond dat eventuele biologische activiteit van het materiaal volgens het tweede criterium, gebaseerd is op een voor insuline kenmerkende structurele conformatie overeenkomstig het eerste criterium.

HOOFDSTUK IV

METHODEN

SCHEIDINGSMETHODE

Gelfiltratie

Hoewel er nog nooit insuline uit bloed geïsoleerd is, wordt algemeen aangenomen dat insuline in een kleinmoleculaire vorm, waarschijnlijk als monomeer met een mol. massa van bijna 6.000, in bloed voorkomt (zie ook Frank e. m. 1972).

Daar wij wilden nagaan of insuline werkelijk alleen als zodanig circuleert of misschien tevens in een vorm met een veel hogere mol. massa, was het nodig het aanwezige kleinmoleculaire insuline te scheiden van de serumeiwitten. De gebruikelijke scheidingsmethoden, zoals b.v. extractie, chromatografie of elektroforese, leken voor dit doel minder geschikt. Men dient er namelijk rekening mee te houden dat labiele verbindingen onder dergelijke omstandigheden veranderingen kunnen ondergaan, waardoor er eventueel complexen zouden kunnen dissociëren of ontstaan en het verkregen materiaal niet meer dezelfde vorm heeft als waarin het in bloed voorkomt. Een methode die deze bezwaren niet of nagenoeg niet heeft en dus geschikt is voor het scheiden van labiele verbindingen is de gelfiltratie, een methode die in 1959 door Porath en Flodin werd geïntroduceerd, en waarbij gebruik gemaakt wordt van dextraan-gel om de opgeloste stoffen op grond van hun molecuulgrootte van elkaar te scheiden.

Methode. Voor ons onderzoek was het nodig insuline te scheiden van de overige serumeiwitten. Daar in eerste instantie niet beoogd werd om naast separatie van insuline ook nog een scheiding van de serumeiwitten zelf te verkrijgen, werd aanvankelijk aan Sephadex G-75 de voorkeur gegeven, omdat volgens de toen geldende opgave moleculen met een massa groter dan 50.000 niet in de gel kunnen doordringen en bijna alle serumeiwitten boven deze limiet liggen. Aangezien een nieuwe partij Sephadex G-75 wel aan de oorspronkelijk gestelde eis voldeed, doch niet het scheidingspatroon gaf zoals aanvankelijk was verkregen, zijn we bij het verdere onderzoek overgegaan op Sephadex G-100, tenzij anders is vermeld.

De gel werd in buffer gebracht en gedurende 24-48 uur hierin bewaard om te zwellen. Hierna werden de kolommen, die een inwendige doorsnede hadden van 2,5 cm tot een hoogte van 40 cm met deze vochtige gel gevuld.

Als elutiemiddel werd aanvankelijk Krebs-Ringer bicarbonaatbuffer (Umbreit e. m. 1957) gebruikt omdat de ionenconcentratie en -samenstelling hiervan goed overeenkomt met die van bloed. Voor zover kon worden nagegaan, werd met 0,1 M veronalbuffer pH 8,5 eenzelfde scheidingspatroon verkregen als met Krebs-Ringer bicarbonaatbuffer, waarna uit praktische overwegingen (buffer beter te bewaren, buizen minder vuil) het meeste werk met deze veronalbuffer gedaan werd. Krebs-Ringer buffer werd hoofdzakelijk gebruikt in die gevallen waarin de verkregen fracties biologisch getest moesten worden. In die gevallen waarbij ook de activiteit in de insulinepiek werd nagegaan, bevatte het elutiemiddel 0,025% (gew/vol) runderalbumine om de adsorptie van insuline aan glas tot een minimum te beperken. De filtratie werd steeds uitgevoerd bij 4°C.

In het begin werden hoeveelheden van 4 ml serum op de kolom gebracht om te worden gescheiden. Voor latere proeven werden als regel volumina van 5 ml gebruikt, zonder dat dit een nadelige invloed had op het scheidingspatroon.

De elutiesnelheid werd geregeld met een peristaltische pomp en bedroeg voor de Sephadex G-100 kolommen steeds ongeveer 25 ml per uur. Met behulp van een foto-electrische druppelteller werden fracties van 64 druppels, ongeveer 4 ml, verzameld. Daar het volume van 64 druppels niet steeds even groot was, werden per kolom steeds 6 fracties gewogen om het volume vast te stellen. Indien meerdere kolommen tegelijk werden gelueerd, werd voor alle kolommen de elutievloeistof met dezelfde pomp, en dus met dezelfde snelheid, op de kolommen gebracht en werden voor alle kolommen de fracties tegelijk gewisseld.

Aanvankelijk werd de eiwitverdeling in het eluaat bepaald door de extinctie van de afzonderlijke fracties te meten bij 280 nm op een Beckman DU spectrofotometer. Later werd tijdens de elutie de transmissie continu gemeten bij 279 nm met behulp van een Uvicord II (LKB).

Meestal werd een geringe hoeveelheid [^{131}I]insuline ter markering aan het te scheiden materiaal toegevoegd. De verdeling van de radioactiviteit in het kolomeluaat werd nagegaan door de afzonderlijke fracties met een gamma-spectrometer bij 364 KeV te meten. Hoewel de verdeling van de radioactiviteit niet een maat is voor de verdeling van de endogene insuline(-achtige) activiteit, was zij zeer geschikt om de verschillende fracties

steeds op overeenkomstige wijze te kunnen indelen.

In de hiervoor in aanmerking komende gevallen werd de insuline-achtige activiteit in de afzonderlijke of de gecombineerde fracties radioimmunologisch en/of biologisch bepaald.

BIOLOGISCHE BEPALINGSMETHODEN

Vetweefsel in vitro

De insuline-achtige activiteit werd in een aantal gevallen bepaald met behulp van geïsoleerd vetweefsel volgens een enigszins gewijzigde methode van Steelman en medewerkers (1960). Deze methode is gebaseerd op het feit dat vetweefsel, dat in een glucosehoudend medium geïncubeerd wordt, glucose uit het medium zal opnemen. Door insuline aan het incubatiemedium toe te voegen kan deze glucoseopname worden gestimuleerd. Tevens is gebleken dat er een lineair verband bestaat tussen de glucoseopname en de logarithme van de insulineconcentratie over het traject 10-150 $\mu\text{E/ml}$, waardoor het mogelijk is met twee concentraties insuline een ijklijn te bepalen. Door na te gaan hoeveel glucose uit het medium wordt opgenomen onder invloed van een onbekend monster kan op de ijklijn worden teruggelezen met hoeveel insuline het stimulerend effect van het onbekende monster overeenkomt.

Methode. Voor de bepaling werd gebruik gemaakt van epididymisvet van normale manlijke ratten met een lichaamsgewicht van 150-160 gram. De dieren waren de middag vóór de bepaling in afzonderlijke kooien geplaatst, zij hadden toegang tot voldoende water en voer. Zestien tot achttien uur later werden de dieren gedecapiteerd en het epididymisvetweefsel verwijderd. Het vetweefsel werd in stukjes van ongeveer 15 mg geknipt en van elk dier werd telkens een stukje in afzonderlijke glazen vaatjes die 2 ml incubatiemedium bevatten, gebracht. Dit gebeurde voor zes ratten, waarbij de stukjes over dezelfde vaatjes werden verdeeld als voor de eerste rat. Uiteindelijk bevatte ieder vaatje dus ongeveer 90 mg vetweefsel afkomstig van zes verschillende ratten.

De vaatjes werden, afhankelijk van het aantal te bepalen monsters, onderverdeeld in enkele groepen van 3-5 vaatjes.

Eén groep diende om de ongestimuleerde glucoseopname, de basisopname, van het vetweefsel te bepalen. Deze vaatjes bevatten 2 ml Krebs-Ringer bicarbonaat buffer (Umbreit e. m. 1957) waarin 2 mg glucose en 2,5 mg runderalbumine per ml buffer

waren opgelost.

Twee groepen vaatjes werden gebruikt voor het bepalen van de ijklijn. Zij bevatten 2 ml buffer met een glucoseconcentratie van 2 mg per ml. Bij de ene groep bevatte de buffer tevens een lage insulineconcentratie, $12\frac{1}{2}$ μ E/ml, terwijl de concentratie in de andere groep 50 μ E/ml bedroeg. Ook aan de incubatiemedia van deze beide standaarden was runderalbumine toegevoegd. De hoeveelheden waren niet steeds voor beide standaarden gelijk en varieerden zodanig dat de hoeveelheid eiwit in een te bepalen monster en in de hiermee overeenkomende standaard niet al te veel verschilden. Toevoegen van eiwit was noodzakelijk, omdat insuline in een eiwitloos medium zeer gemakkelijk aan glas adsorbeert en dan niet meer beschikbaar is om de glucoseopname te stimuleren. Hoewel geringe hoeveelheden eiwit reeds voldoende zijn om de adsorptie tegen te gaan, is het met elkaar in overeenstemming brengen van de eiwitconcentraties van het monster en de overeenkomstige standaard wenselijk, omdat eiwit alléén reeds een gering stimulerend effect heeft op de glucoseopname en een verschil in eiwitconcentratie het resultaat dus zou kunnen beïnvloeden.

De overige groepen incubatievaatjes werden gebruikt voor het meten van de activiteiten in onbekende monsters. Wanneer de totale insuline-achtige activiteit van een monster bepaald werd, werd het effect hiervan op de glucoseopname nagegaan in twee concentraties, die evenals de standaardconcentraties een factor 4 van elkaar verschilden. Op deze wijze werd tevens een inzicht verkregen of de regressielijnen voor de standaard en het monster wel parallel liepen. Om na te gaan welk deel van het stimulerend effect door insuline veroorzaakt werd, werd de glucoseopname onder invloed van één dosering van het onbekende monster vergeleken met de glucoseopname die werd gemeten wanneer aan dezelfde hoeveelheid van het onbekende monster 30-60 minuten voor de aanvang van de incubatie een overmaat anti-insulineserum was toegevoegd. Een verminderde glucoseopname in het tweede geval was dan veroorzaakt doordat het in het onbekende monster aanwezige insuline door het antiserum was geneutraliseerd.

De vaatjes werden gedurende vier uur bij 37°C onder een gasmengsel van 95% O₂ en 5% CO₂ in een Dubnoff-incubator geïncubeerd. Hierna werd het vet uit de vaatjes gehaald, met filterpapier gedroogd en vervolgens gewogen. Het glucosegehalte van de media werd in triplo bepaald met de anthronmethode (Seifter e. m. 1950, Bouman & Dermer 1960). Door dit gehalte te vergelijken met de oorspronkelijk aanwezige concentratie kon berekend worden hoeveel mg glucose per gram vetweefsel was

opgenomen. Bij een gedeelte van de bepalingen werd het glucosegehalte met een "auto-analyser" (Technicon) volgens de ferri-cyanide-methode bepaald (Hoffman 1937).

In het geval dat het onbekende monster in twee concentraties bepaald werd tegen twee concentraties van het standaardpreparaat werd het gehalte berekend volgens de methode van een $(2 + 2)$ puntsijking zoals deze uitvoerig is beschreven door Burn e. m. (1952) en door de statistische afdeling van de N.V. Organon te Oss in gecompriëerde vorm is uitgewerkt. Wanneer het onbekende monster slechts in één verdunning bepaald werd, dan werd de insuline-achtige activiteit berekend volgens de methode van een $(2 + 1)$ puntsijking (Colquhoun 1971).

Diafragma in vitro

Deze methode werd voor het eerst in 1952 toegepast door Groen en medewerkers. Zij berust op het feit dat diafragma's die in een glucosehoudend medium geïncubeerd worden, glucose uit dit medium opnemen. Deze opname kan gestimuleerd worden door insuline, waarbij de mate van stimulering afhankelijk is van de hoeveelheid toegevoegd hormoon. Op deze wijze is het mogelijk om, evenals bij vetweefsel, met bekende hoeveelheden insuline een ijklijn te maken en met behulp van deze ijklijn de insuline-achtige activiteit in een onbekend monster te bepalen.

Voor ons werk was het echter niet noodzakelijk om de activiteit kwantitatief te bepalen. Wij wensten alleen te weten of er insuline-achtige activiteit in onze preparaten aanwezig was, en zo ja, of deze activiteit ook met anti-insulineserum geneutraliseerd kon worden.

Methode. Voor de bepaling werden vrouwelijke ratten met een lichaamsgewicht van 120-125 gram gebruikt. De dieren waren de middag vóór de bepaling in afzonderlijke kooien geplaatst en voorzien van voldoende water en ongeveer 10 gram voer. Ongeveer 16 uur later werden de dieren gedecapiteerd, de diafragma's verwijderd en telkens een half diafragma in een incubatievaatje gebracht. Om zo homogeen mogelijk weefsel te krijgen werden de hemidiafragma's gedurende 30 minuten bij 37°C gepreïncubeerd in Krebs-Ringer buffer (Umbreit e. m. 1957) waarin per ml 2 mg albumine en 2 mg glucose waren opgelost.

Voor de bepaling werden de vaatjes onderverdeeld in 6 groepen. Eén groep diende om de basisopname te meten en bevatte 2 ml Krebs-Ringer buffer met albumine en glucose. Een tweede groep bevatte dezelfde bufferoplossing als groep één waarin bovendien een hoeveelheid insuline van 200 μ E/ml was opgelost. De overige

groepen dienden voor het bepalen van de glucoseopname onder invloed van een onbekend eiwitpreparaat. De vaatjes bevatten 2 ml buffer waarin per ml waren opgelost 2 mg glucose en 5 mg van het eiwitpreparaat met of zonder toevoeging van een overmaat anti-insulineserum.

Nadat de diafragma's gedurende 30 minuten waren gepreïncubeerd, werden zij overgebracht in de voor de bepaling bestemde vaatjes en 60 minuten geïncubeerd. Aan het eind van deze 60 minuten werden de diafragma's uit de media gehaald en gedurende 4 uur bij 80°C gedroogd waarna het gewicht van de droge diafragma's werd bepaald. Met de anthronmethode (Seifter e. m. 1950, Bouman & Dermer 1960) werd nagegaan hoeveel glucose er na de incubatie nog in de media aanwezig was, waaruit dan de glucoseopname in mg/100 mg droog diafragmaweefsel berekend kon worden.

In vivo methode

Deze methode werd beschreven door Rafaelsen en medewerkers (1965) en uitgevoerd volgens een door Mulder en Bakker enigszins gewijzigde methode van Young (1967). De bepalingmethode berust op de locale werking die insuline heeft als het intraperitoneaal wordt geïnjecteerd. Enige tijd na de intraperitoneale toediening van insuline of een onbekend monster wordt het effect hiervan op de glycogeen- en de vetsynthese in het diafragma en epididymisvetweefsel nagegaan.

Methode. Jonge manlijke ratten met een lichaamsgewicht van 60-70 gram werden de middag vóór de bepaling in aparte kooien geplaatst. De dieren kregen voldoende water doch geen voer. Ongeveer 18 uur later werden de dieren intraperitoneaal ingespoten met 1 ml fysiologische zoutoplossing waarin waren opgelost 2 mg runderalbumine, 1 μ Ci uniform gemerkt [14 C]glucose en de gewenste hoeveelheid gezuiverd insuline of onbekende stof. Tevens werd gecontroleerd of de testes nog wel in de buikholte lagen hetgeen bij deze jonge dieren meestal het geval was. Na twee uur werden de dieren onder narcose gebracht door 3,5 mg Nembutal®/100 g lichaamsgewicht intraveneus toe te dienen. Tien minuten later werden de dieren gedecapiteerd en het diafragma en het epididymisvetweefsel verwijderd.

Het diafragma werd in tweeën geknipt en na gewogen te zijn werd iedere helft gedestruëerd door het 12 minuten te koken in 1 ml 30% KOH. Na afkoelen werd 0,4 ml van een 2%-ige natriumsulfaatoplossing en 3,2 ml absolute ethanol toegevoegd. De buizen werden gedurende 90 minuten bij -40°C weggezet waar-

door een precipitaat van glycogeen ontstond. Vervolgens werd gecentrifugeerd waarna het precipitaat werd gewassen met 2 ml 66% ethanol. Het precipitaat werd gedroogd en hierna weer opgelost in 0,5 ml water.

De beide stukjes epididymisvet werden gewogen en gedurende ongeveer 18 uur bij 4°C geëxtraheerd met 5 ml chloroform-methanol (2 : 1). Hierna werden de stukjes vetweefsel uit de vaatjes gehaald en behandeld zoals hierboven is beschreven voor de glycogeenbepaling in het diafragma. Het chloroform-methanol extract dat het extraheerbare vet bevatte, werd gedroogd door het extractiemiddel te verdampen.

Aan de glycogeenoplossingen en de droge chloroform-methanol extracten werd 10 ml scintillatievloeistof volgens Bray (1960) toegevoegd, waarna de radioactiviteit in een vloeistofscintillatieteller werd gemeten. Op deze wijze werd het aantal scintillaties per minuut (cpm) geteld. Daar dit slechts een deel is van het werkelijke aantal desintegraties van het ^{14}C (dpm), werden de cpm's omgerekend tot dpm's. De incorporatie van het ^{14}C in glycogeen of vet werd uitgedrukt in dpm/mg weefsel.

RADIOIMMUNOLOGISCHE BEPALINGSMETHODE

Radioimmunologische bepalingsmethoden voor insuline berusten op het principe dat een bepaalde hoeveelheid antilichamen in staat is een constante hoeveelheid [^{131}I]insuline te binden. Wordt aan dit antigeen-antilichaammengsel enig niet-gemerkt insuline toegevoegd, dan zal een gedeelte van de radioactiviteit die aan het antilichaam gebonden kan worden, vervangen worden door niet-gemerkt insuline. Het percentage radioactiviteit dat aan antilichamen gebonden is zal hierdoor afnemen. Naarmate er meer niet-gemerkt insuline in het medium aanwezig is, zal minder radioactiviteit door de antilichamen gebonden worden, zodat het percentage gebonden radioactiviteit een maat is voor de hoeveelheid niet-gemerkt insuline in het te bepalen medium.

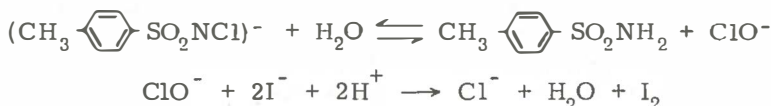
Bereiding [^{131}I]insuline

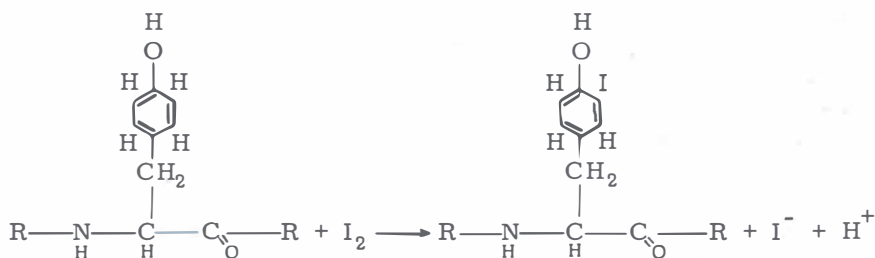
Bij de radioimmunologische bepalingsmethode voor insuline volgens Yalow en Berson (1960), zoals deze door ons werd gebruikt, moet de radioactiviteit van zeer geringe hoeveelheden [^{131}I]insuline (minder dan 2×10^{-10} gram) gemeten worden. Om tot een bruikbaar aantal tellingen per minuut (cpm) te komen is het nodig de beschikking te hebben over [^{131}I]insulinepreparaten met een hoge specifieke activiteit. Aan de andere kant mag de

specifieke activiteit ook weer niet te hoog zijn, daar anders het insuline als gevolg van te veel straling beschadigd zou kunnen worden (Yalow & Berson 1956, Berson & Yalow 1957).

Behalve voor de radioimmunologische bepaling wensten wij het radioinsuline ook nog als "tracer" te gebruiken om het gedrag van insuline in een aantal systemen te kunnen volgen. Hiervoor was het noodzakelijk dat de fysische-, immunologische- en biologische eigenschappen van het [^{131}I]insuline zoveel mogelijk gelijk moesten zijn aan die van het niet-gemerkte insuline. Door verschillende onderzoekers is gevonden dat hieraan wordt voldaan bij een joderingsgraad van maximaal 1 joodatoom per insulinemolecuul (de Zoeten & van Strik 1961, Izzo e. m. 1964, Brunfeldt e. m. 1968). Om een zo hoog mogelijke specifieke activiteit bij een zo laag mogelijke joderingsgraad te verkrijgen was het nodig voor het joderingsproces gebruik te maken van z.g. dragervrije Na^{131}I -preparaten. Dit geldt temeer, daar het ^{131}I verkregen wordt door bestraling van telluur, dat uit verschillende isotopen bestaat, waardoor naast ^{131}I ook de isotopen ^{129}I en ^{127}I worden gevormd. De percentages waarin deze drie isotopen in het product voorkomen zullen variëren met de tijd die verlopen is sedert de bestraling. Van de door ons gebruikte preparaten zal het isotoop ^{131}I maximaal 20% van het totale jodide uitmaken (Brunfeldt 1965). Dit betekent dat een joderingsgraad van gemiddeld 1 joodatoom per insulinemolecuul overeenkomt met een specifieke activiteit van ongeveer 500 mCi/mg insuline.

De bereiding van [^{131}I]insuline geschiedde volgens de chlooramine-T methode, zoals deze ontwikkeld was door Hunter & Greenwood (1962) voor de bereiding van [^{131}I]groeihormoon en door Banerjee & Gibson (1962) voor insuline was gemodificeerd. Deze methode is zeer geschikt voor joderingen op laboratoriumschaal daar geen speciale voorzieningen nodig zijn. In tegenstelling tot andere joderingsprocedures waarbij met hoeveelheden van 10 mCi tot zelfs meer dan 50 mCi ^{131}I moet worden gewerkt, wordt bij de chlooramine-T methode slechts ongeveer 2 mCi ^{131}I gebruikt, terwijl de reactie uitgevoerd kan worden in het flesje waarin het Na^{131}I wordt geleverd. Deze methode is zeer efficiënt wat de binding van het isotoop aan insuline betreft daar voor de oxidatie van het $^{131}\text{I}^-$ een overmaat chlooramine-T wordt gebruikt, waardoor een groot deel van het $^{131}\text{I}^-$ dat bij de substitutie vrijkomt weer opnieuw geoxideerd kan worden (Brunfeldt 1967).





Door het jood worden één of meer tyrosylresten van het insuline op één of beide orthoplaatsen gesubstitueerd.

Methode. De joderingen werden alle verricht met het Na¹³¹I-preparaat IBS.3 van "The Radiochemical Centre, Amersham". Dit preparaat werd ontvangen in hoeveelheden van 2-2,5 mCi in 0,05 ml natriumhydroxideoplossing pH 8-10. Hieraan werd toegevoegd 2,5 µg insuline in 0,025 ml boraatbuffer pH 8,0 en 50 µg chlooramine-T in 0,025 ml boraatbuffer. Na 15 seconden werd de reactie gestopt door 120 µg natriummetabisulfiet in 0,1 ml boraatbuffer toe te voegen. Om het mengsel met minder verlies uit het reactievaatje te kunnen verwijderen werd het volume vergroot tot 0,5 ml door 0,3 ml boraatbuffer toe te voegen.

Om het niet aan insuline gebonden ¹³¹I te verwijderen werden door ons 2 methoden toegepast, aanvankelijk werd gedialyseerd, terwijl wij de laatste jaren filtreerden over Sephadex G-25. De daarop volgende scheidingen van het "beschadigde" en intacte [¹³¹I]insuline verschilden slechts in details.

In verband met het zeer geringe volume dat gedialyseerd moest worden werd gebruik gemaakt van Visking dialyseslang 8/32". Om eventueel in de slang aanwezige stoffen, die een nadelige invloed op het insuline zouden kunnen hebben, te verwijderen, werd de slang voor het gebruik twee maal gedurende korte tijd in gedestilleerd water gekookt. Direct na de jodering werd het mengsel uit het reactievaatje overgebracht in de dialyseslang en gedurende drie maal 30 minuten bij 4°C gedialyseerd tegen telkens 2 l water. Op deze wijze werd de niet aan het insuline gebonden radioactiviteit snel van het [¹³¹I]insuline gescheiden waardoor de beschadiging van het [¹³¹I]insuline als gevolg van externe straling tot een minimum werd beperkt.

Het is mogelijk dat tijdens de joderingsprocedure een gedeelte van het insuline door straling en/of oxidatie beschadigd wordt. Om dit beschadigde materiaal te scheiden van het intacte insuline werd gebruik gemaakt van de eigenschap van beschadigd insuline dat het zich gemakkelijk aan serumeiwitten hecht (Ber-

son e.m. 1956), waardoor scheiding op basis van verschil in molecuulgrootte mogelijk is. Het gedialyseerde materiaal werd daarom gemengd met 0,5 ml serum en op een Sephadex G-75 kolom (30 x 1 cm) gebracht, waarna geëluëerd werd met veronalbuffer pH 8,5. Fracties van ± 1 ml werden opgevangen in 9 ml veronalbuffer waaraan 0,025% albumine was toegevoegd. Deze onmiddellijke verdunning van het eluaat werd toegepast om de hoeveelheid radioactiviteit per volume-eenheid tot een minimum terug te brengen en hierdoor beschadiging van het insuline tengevolge van externe straling te beperken. De toevoeging van eiwit gaat niet alleen de adsorptie van insuline aan het glas tegen, doch heeft daarnaast ook een beschermende werking tegen stralingsbeschadiging (Yalow & Berson 1956). De radioactiviteit in de fracties werd gemeten en de topfracties van de tweede radioactieve piek werden voor verder werk gebruikt. De insulineconcentraties in deze fracties werden berekend en een gedeelte hiervan zo ver doorverdund als voor gebruik in de radioimmunologische bepaling voor insuline nodig was.

Werd Sephadex G-25 gebruikt om [^{131}I]insuline te bevrijden van het niet-gebonden ^{131}I , dan werden, vlak voordat het reactiemengsel op de Sephadex-kolom (30 x 1 cm) werd gescheiden, enkele druppels runderserum op de kolom gebracht om het Sephadex met eiwit te verzadigen en zodoende adsorptie van insuline tegen te gaan. De kolom werd geëluëerd met veronalbuffer die 0,025% albumine bevatte. Fracties van ± 1 ml werden opgevangen. Om het beschadigde en intacte [^{131}I]insuline van elkaar te scheiden werden 3 of 4 fracties van de insulinepiek van de Sephadex G-25 kolom gecombineerd en gemengd met 1,5 ml runderserum. Hierna werd het mengsel op een Sephadex G-75 kolom (40 x 2 cm) gebracht en geëluëerd met veronalbuffer 0,025% albumine. Nu werden fracties van ± 5 ml opgevangen.

De scheiding van het [^{131}I]insuline en het niet-gebonden ^{131}I met behulp van Sephadex G-25 verloopt veel sneller dan met dialyse, waardoor een aanzienlijke tijdwinst werd verkregen en mogelijk ook de stralingsbeschadiging geringer was. De G-25 gezuiverde preparaten vertoonden althans na de tweede zuivering een aanzienlijk geringere beschadiging dan het gedialyseerde materiaal.

Van de geselecteerde fracties werd steeds nagegaan hoeveel procent van de totale hoeveelheid [^{131}I]insuline "beschadigd" was. Dit geschiedde door middel van een eenvoudige papierchromatografische methode waarbij het intacte insuline op de opbrengplaats achterblijft en het "beschadigde" materiaal zich met de vloeistofstroom verplaatst. Het bleek dat het reactiemengsel een aanzienlijk deel "beschadigd" insuline bevatte. In de insu-

linefracties van de Sephadex G-25 kolom werden hoeveelheden "beschadigd" insuline aangetoond die 20-40% van de totale hoeveelheid radioactief materiaal vertegenwoordigen. Na de zuivering over de Sephadex G-75 kolom (40 x 2 cm) werd in de geselecteerde fracties als regel 4-10% "beschadigd" insuline aangetoond. Deze "beschadiging" nam langzaam in de tijd toe.

Bereiding en selectie van antisera

De antisera tegen insuline werden bereid volgens de methode van Moloney & Coval (1955). Kristallijn runderinsuline werd opgelost in gedestilleerd water dat met zoutzuur op pH 2-3 was gebracht. Aan de insulineoplossing werd een gelijk volume Freund's adjuvant toegevoegd waarna het geheel werd geëmulgeerd. De eindconcentratie van het insuline bedroeg 1 mg per ml emulsie.

De te immuniseren caviae kregen ieder 1 ml van de emulsie (25 E insuline) subcutaan toegediend. De hypoglycaëmiën die hierdoor ontstonden werden bestreden door de dieren glucose toe te dienen. Nog twee maal werd insuline toegediend, resp. 4 en 8 weken na de eerste injectie. Eén week na de laatste injectie werden de dieren verbloed. Het bloed werd 1½ uur bij kamertemperatuur bewaard om te stollen, waarna het serum verzameld werd.

De antisera werden getest op hun bruikbaarheid in de radioimmunologische bepaling. Als eerste werden de titers aan insulinebindende antilichamen van deze sera met elkaar vergeleken. Hiertoe werd aan een constante hoeveelheid van ongeveer 11 μ E [131 I]insuline antiserum in verschillende verdunningen toegevoegd, waarbij steeds gezorgd werd dat het eindvolume 0,5 ml bedroeg. De verdunning werd uitgevoerd met veronalbuffer pH 8,5 die 0,25% albumine bevatte. De mengsels werden gedurende 4 dagen bij 6°C bewaard waarna het niet-gebonden [131 I]insuline en het insuline-antilichaamcomplex met behulp van papierchromatografie van elkaar werden gescheiden. Een vergelijking van de titer aan insulinebindende antilichamen was mogelijk door die verdunning waarbij 50% van het [131 I]insuline gebonden werd als maat voor de titer te nemen. Enkele van deze verdunningscurven zijn weergegeven in fig. 1.

Geven de titers aan in welke verdunning een bepaald antiserum gebruikt zou kunnen worden, zij geven geen informatie over de bruikbaarheid hiervan in de radioimmunologische bepaling. Hiervoor is het nodig dat bij de te gebruiken antiserumverdunning het percentage van het [131 I]insuline dat aan antilichamen is gebonden sterk afneemt, wanneer een geringe hoe-

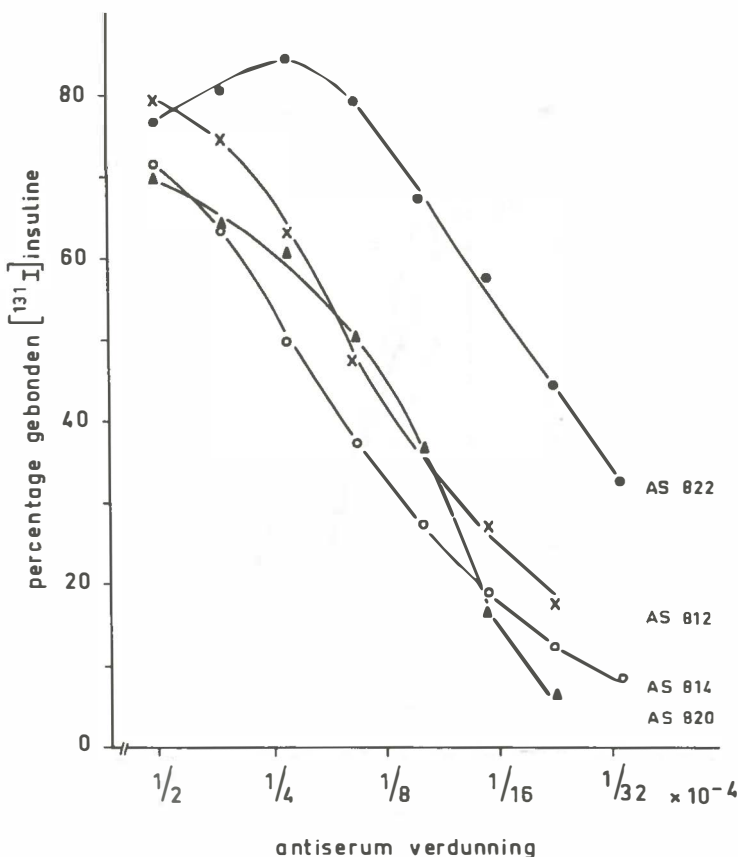


Fig. 1. Titerbepaling anti-insuline-carvaiserum. Weergegeven zijn de percentages van de radioactiviteit van $\pm 11 \mu\text{E}$ ($\approx 0,45 \text{ ng}$) $[^{131}\text{I}]$ insuline die gebonden zijn door antisera in verschillende verdunningen.

veelheid niet-gemerkt insuline aan het medium wordt toegevoegd. Om deze verandering in de bindingspercentages na te gaan werd aan 0,05 ml $[^{131}\text{I}]$ insuline-oplossing 0,05 ml niet-gemerkt insuline in verschillende concentraties en 0,40 ml antiserum in de gewenste verdunning toegevoegd. Fig. 2 laat zien dat het toevoegen van eenzelfde hoeveelheid insuline niet voor alle antisera een even sterke daling van het bindingspercentage van de radioactiviteit tot gevolg heeft. Daar vaak juist geringe hoeveelheden insuline gemeten zouden moeten worden, was het belangrijk om een antiserum te gebruiken dat bij een gering verschil in insulineconcentratie een zo groot mogelijk verschil in bindingspercentage laat zien. Op grond hiervan werd antiserum 812

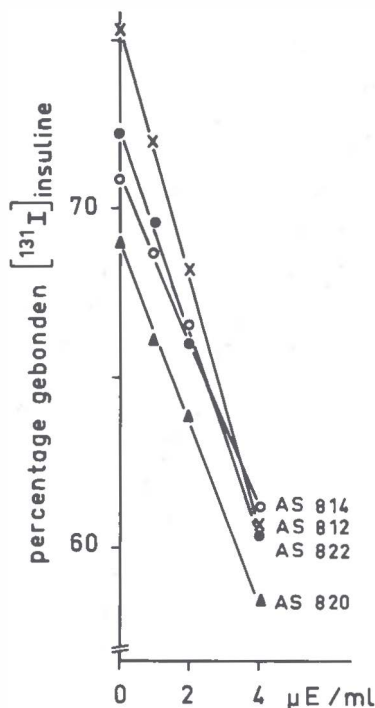


Fig. 2. Effect van geringe hoeveelheden niet-germerkt insuline op de binding van $[^{131}\text{I}]$ insuline door enige antisera.

gekozen voor het gebruik in de radioimmunologische bepaling. Daar het antiserum opgewekt was met runderinsuline en de radioimmunologische bepaling ook gebruikt zou worden voor andere soorten insuline, werd nagegaan of er voldoende kruisreactie was met deze soorten. Het antiserum vertoonde een matige kruisreactie met ratte-insuline, zodat het minder geschikt was voor de bepaling van dit soort insuline (fig. 3). Daarom werden ook tegen ratte-insuline antisera bereid die op de hierboven beschreven methode werden getest en die een gevoelige bepaling van dit hormoon mogelijk maakten.

Bepalingsmethode

Wordt aan een "tracer"-hoeveelheid $[^{131}\text{I}]$ insuline een zodanige hoeveelheid antiserum toegevoegd dat b.v. 2/3 van de radioactiviteit aan de antilichamen wordt gebonden, dan zal de hoeveelheid gebonden radioactiviteit afnemen naarmate meer niet-germerkt insuline in het medium aanwezig is. De afname van de

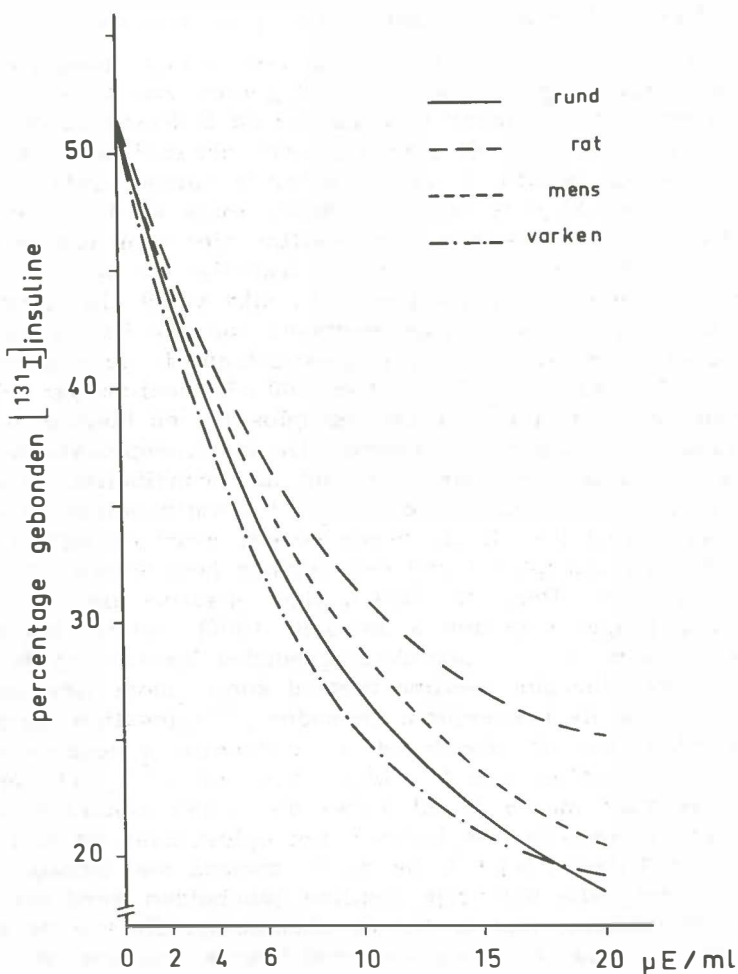


Fig. 3. Effect van biologisch equivalente hoeveelheden niet-gemerkt insuline van verschillende diersoorten op de binding van radioactief runderinsuline door een anti-runderinsuline-caviaserum.

ze hoeveelheid gebonden $[^{131}\text{I}]$ insuline (B) zal gepaard gaan met een toename van de hoeveelheid vrij radioactief insuline (F). Door de veranderingen in de verdeling van de radioactiviteit grafisch uit te zetten tegen de concentratie niet-gemerkt insuline in het medium verkrijgt men een ijklijn. Door Yalow en Berson werd de B/F-verhouding uitgezet tegen de concentratie. Wij gaven er de voorkeur aan om het bindingspercentage, dus

$\frac{B}{B + F} \times 100\%$, als maat te nemen. De op deze wijze verkregen ijklijn was een "rechte" in het gebied van de lage insulineconcentraties, terwijl de kromming in het gebied van de hoge insulineconcentraties geringer was dan bij de B/F-verhouding, waardoor de aflezing in dit gebied minder onnauwkeurig is.

Om het insulinegehalte in een monster te kunnen meten is het nodig eerst een ijklijn te bepalen. Daar, zoals uit fig. 3 blijkt, de reactie van het antiserum met insuline niet voor iedere soort gelijk is, is het wenselijk zo niet noodzakelijk dat voor de ijklijn insuline van dezelfde diersoort gebruikt wordt als in het te bepalen monster. De bindingspercentages voor de ijklijn werden bepaald door 0,05 ml van de insulinesandaard in de concentraties 0, 10, 20, 40, 60, 100, 150 en 200 μ E insuline per ml, te mengen met 0,05 ml [131 I]insulineoplossing en hieraan 0,40 ml verdund antiserum toe te voegen. De insulineoplossingen en de antiserumverduunning waren gemaakt in veronalbuffer waaraan 0,25% albumine was toegevoegd, de [131 I]insulineoplossing bevatte 0,025% albumine. Zoals reeds eerder werd vermeld bevatten de [131 I]insulineoplossingen een geringe hoeveelheid "beschadigd" insuline. Daar dit "beschadigd" insuline niet met antiserum zou reageren (Yalow & Berson, 1960), terwijl het bij de scheiding van vrij en antilichaamgebonden insuline op de plaats van het gebonden insuline terecht komt, moet hiervoor een correctie op de hoeveelheid gebonden [131 I]insuline aangebracht worden. Om de grootte van de correctie te bepalen werd, gelijk met het inzetten van de ijklijn, 0,05 ml [131 I]insulineoplossing verdund met 0,45 ml buffer die 0,25% albumine, doch geen antiserum bevatte. De buisjes met oplossingen werden gedurende 3 of 4 dagen bij 6°C bewaard, waarna met behulp van papierchromatografie het vrije insuline gescheiden werd van het insuline-antilichaamcomplex. Uit de chromatografie van de verdunde "tracer"oplossing werd berekend hoeveel radioactiviteit in niet aan antilichamen gebonden vorm werd verplaatst, waarna de hoeveelheid gebonden insuline hiervoor werd gecorrigeerd.

Na deze correctie kon $\frac{B}{B + F} \times 100\%$ worden berekend en de ijklijn worden uitgezet.

De antiserum- en "tracer" verdunningen werden zodanig gekozen dat bij gebruik van het antiserum tegen runderinsuline ongeveer 65% van het [131 I]insuline werd gebonden in het geval dat geen extra insuline was toegevoegd. Hierdoor werd een systeem verkregen met maximale gevoeligheid waarvan de ijklijnen lineair zijn in het gebied van de lage insulineconcentraties.

De onbekende monsters werden op overeenkomstige wijze behandeld als de insulineverduunningen voor de ijklijn. In plaats

van 0,05 ml insulineoplossing werden nu echter 0,05 ml van het te bepalen monster gemengd met 0,05 ml [^{131}I]insuline en 0,40 ml antiserumverdunding. Ook voor de monsters werd de hoeveelheid "beschadigd" insuline bepaald door 0,05 ml monster te mengen met 0,05 ml [^{131}I]insuline en 0,40 ml buffer die 0,25% albumine, doch geen antiserum bevatte. Het is nl. gebleken dat ook de monsters een beschadigende invloed op het [^{131}I]insuline kunnen hebben, reden waarom dus voor ieder monster deze beschadiging moet worden nagegaan. Na correctie van de verplaatste radioactiviteit voor de hoeveelheid "beschadigd" insuline werd voor de monsters het bindingspercentage berekend. Met behulp van de ijklijn kon dan de met het bindingspercentage overeenkomende insulineconcentratie in het monster afgelezen worden.

Scheiding van vrij en gebonden insuline

Voor de scheiding van vrij en aan antilichaam gebonden insuline werd gebruik gemaakt van de eigenschap van insuline dat het zeer gemakkelijk aan cellulose geadsorbeerd wordt (Kallee 1952). Deze eigenschap bezitten het insuline-antilichaamcomplex en het beschadigde insuline niet meer (Yalow & Berson 1960). Door nu een mengsel van insuline, insuline-antilichaamcomplex en beschadigd insuline met cellulose samen te brengen zal alleen het intacte insuline hieraan worden geadsorbeerd en op deze wijze van het antilichaamcomplex en beschadigd insuline geïsoleerd kunnen worden. Hiervan werd door Berson e.m. (1956) gebruik gemaakt bij hun onderzoek naar het voorkomen van antilichamen bij patiënten die met insuline waren behandeld. Zij scheidden het vrije en het aan antilichamen gebonden [^{131}I]insuline met behulp van papierelectroforese waarbij het vrije insuline op de opbrengplaats aan het cellulose werd geadsorbeerd, terwijl het insuline-antilichaamcomplex zich verplaatste met de γ -globulines. Later gebruikten deze onderzoekers als regel de "chromato-electroforese". Hierbij vond de elektroforese plaats in een open bak waardoor de eiwitten zich niet alleen verplaatsen als gevolg van een elektrisch potentiaalverschil doch tevens doordat er een vloeistofstroom in het papier optreedt als gevolg van verdamping.

Overeenkomstig de gunstige ervaringen van Maingay (1964) werd door ons voor de scheiding alleen chromatografie in niet afgesloten bakken toegepast zonder dat er een potentiaalverschil op het papier werd aangebracht.

Aan het te scheiden medium, dat steeds een volume van

0,50 ml had, werd 0,05 ml serum van nuchtere caviae toegevoegd om het eiwitgehalte te verhogen waardoor betere scheiding tussen het vrije [^{131}I]insuline en de zich verplaatsende radioactiviteit werd verkregen. Zou nl. te weinig eiwit in het medium aanwezig zijn, dan zal het gebonden insuline zich wel verplaatsen, doch zal er onderweg steeds radioactiviteit achterblijven waardoor "trailing" optreedt.

Voor de chromatografie werden strookjes Whatman 3 MM papier van 23 x 4 cm gebruikt. Hierop werden op afstanden van 10 en 17 cm van een van de uiteinden lijnen aangebracht. Op de lichtbevochtigde stroken werd op de 10 cm lijn (start) 0,3 ml van het inzetmedium gebracht. Op deze startlijn werd tevens een zeer geringe hoeveelheid broomfenolblauwoplossing gebracht om de plaats van de migrerende eiwitten te markeren. Vervolgens werden de stroken horizontaal gespannen, terwijl het uiteinde aan de kant van de startlijn in veronalbuffer 0,25% albumine hing. Als gevolg van de capillaire werking van het papier enerzijds en de verdamping aan de lucht anderzijds ontstaat er een vloeistofstroom in het papier, waardoor het insuline-antilichaamcomplex en/of het "beschadigde" insuline tezamen met de serumeiwitten worden verplaatst, terwijl het vrije insuline op de startlijn achterblijft. De verplaatsing van de eiwitten kon door de toegevoegde kleurstof worden gevolgd. Zodra deze vlek bij de 17 cm lijn was aangekomen, hetgeen na ongeveer 1 uur het geval was, werd de chromatografie beëindigd en de stroken gedroogd. Na de chromatografie blijkt de radioactiviteit op de stroken in twee gebieden verdeeld te zijn. De radioactiviteit op de opbrengplaats wordt veroorzaakt door geadsorbeerd [^{131}I]insuline (F), terwijl het andere radioactieve gebied samenvalt met de kleurstofvlek en veroorzaakt wordt door gebonden (B) en/of "beschadigd" insuline. Ergens tussen deze twee radioactieve pieken bevindt zich een traject waar de radioactiviteit minimaal is. Door de vlek steeds tot de 17 cm lijn te laten lopen kon een goede reproduceerbaarheid van de plaats van dit minimum verkregen worden. Hierdoor was het mogelijk de stroken steeds in het minimum door te snijden en de radioactiviteit in B en F te meten zonder voorafgaande "scanning" van de strook.

Voor de chromatografie werd niet het gewone Whatman 3 MM chromatografiepapier gebruikt doch de kwaliteit "not selected for chromatography". Met deze kwaliteit werd een bruikbare scheiding tussen vrij en gebonden insuline verkregen, terwijl dit niet het geval was met papier van de chromatografiekwaliteit. Iedere partij papier werd na ontvangst getest op het scheidend vermogen, omdat dit, vooral in de beginperiode, niet altijd even goed was.

Opzet van de bepaling

Voor de bepaling van het insulinegehalte in onbekende monsters moet, zoals reeds werd vermeld, eerst een ijklijn vastgelegd worden. De eindconcentraties van het insuline in het bepalingssysteem voor de ijklijn bedroegen 0, 1, 2, 4, 6, 10, 15 en 20 $\mu\text{E/ml}$. De bindingspercentages voor deze punten werden in duplo bepaald met uitzondering van de "nulwaarde" die in viervoud bepaald werd. De bepaling van het beschadigingspercentage voor de ijklijn geschiedde eveneens in duplo. In totaal werden dus voor de ijklijn 20 monsters gechromatografeerd waaruit 40 radioactiviteitsmetingen resulteerden. Daar altijd een zekere achtergrondstraling aanwezig is, werd iedere radioactiviteitsmeting voor deze achtergrondstraling gecorrigeerd, voordat verdere berekeningen werden uitgevoerd.

De onbekende monsters werden eveneens in duplo bepaald. Voor correctie voor "incubatiebeschadiging" werd met het oog op eventuele verschillen in samenstelling van de monsters, zoals b.v. bij plasma, voor ieder monster het beschadigingspercentage in enkelvoud gemeten. Waren de monsters echter opgelost in hetzelfde medium, zodat geen verschillen in beschadigingspercentage verwacht werden, dan werd het beschadigingspercentage van 4 willekeurige monsters bepaald en het gemiddelde hiervan gebruikt voor de berekening der bindingspercentages.

Hoewel de berekeningen zeer eenvoudig zijn, is de hoeveelheid rekenwerk omvangrijk, terwijl bovendien naderhand een ijklijn moet worden getekend, waarna de gehalten der onbekende monsters hierop kunnen worden afgelezen. Bij een aantal van 4 bepalingssreeksen per week is hier meer dan een volledige werkdag voor één persoon voor nodig.

In samenwerking met Dr. D.W. Smits van het rekencentrum der R.U. werd een programma opgesteld voor machinale verwerking van de gegevens. De meetresultaten worden hiertoe op een ponsband geregistreerd. In deze band zijn vooraf een aantal gegevens geponst die nodig zijn voor administratie van de uitkomsten, zoals b.v. welk soort insuline werd bepaald, welke standaardinsuline en welk antiserum hiervoor gebruikt werden. Tevens moeten de instructies voor de computer worden ingeslagen om aan te geven welk deel van het programma moet worden gebruikt, d.w.z. of de onbekende monsters moeten worden uitgerekend met ieder een eigen beschadigingsbepaling of dat er 4 beschadigingsbepalingen zijn voor een serie monsters. De punten voor de ijklijn worden door de

computer uitgerekend, waarna deze met de methode van de kleinste kwadraten de best passende lijn door deze punten berekent. Meetpunten die meer dan 3 standaarddeviaties van de berekende ijklijn afwijken, worden als "uitbijter" aangeduid en niet meer gebruikt voor de berekening van deze ijklijn. De bindingspercentages voor de onbekende monsters worden door de computer op deze ijklijn afgelezen en de bijbehorende insulinegehalten afgedrukt (Konijnendijk & Smits 1968).

Gevoeligheid van de bepaling

De gevoeligheid van onze radioimmunologische methode werd nagegaan voor 10 bepalingen waarbij runderinsuline als standaardpreparaat werd gebruikt en die gedaan zijn over een periode van 28 maanden. Als enige voorwaarde was gesteld dat de nulwaarden van de standaardlijnen geen uitbijters mochten bevatten, voor het overige waren de bepalingen willekeurig gekozen. Van de nulwaarden van de 10 standaardlijnen werd de gemiddelde standaarddeviatie berekend. Met behulp van deze waarde werd voor ieder van de 10 bepalingen de grens van het spreidingsgebied voor de nulwaarde bepaald ($p < 0,05$). Het gemiddelde van deze grenswaarde werd als ondergrens van bepaalbare activiteit genomen. Voor deze 10 standaardlijnen berekenden we $s = 0,61$ waaruit gevonden werd dat de ondergrens voor onze bepaling $0,3 \mu\text{E/ml}$ (eindconcentratie) bedraagt.

HOOFDSTUK V

ENDOGEEN INSULINE IN RUNDERSERA

Aan het slot van Hoofdstuk III hebben we de vraagstelling voor ons onderzoek geformuleerd. Tevens is daar aangegeven aan welke voorwaarde de door ons gebruikte scheidingsmethode (gel-filtratie over Sephadex G-100) moet voldoen en welke de criteria zijn waaraan eventueel in de eiwitfracties aan te treffen activiteit moet voldoen teneinde dit als insuline te kunnen bestempelen. In dit hoofdstuk hebben we deze voorwaarde en criteria getest op rundersera en de daaruit verkregen eiwitfracties.

SCHEIDING VAN EXOGEEN EN ENDOGEEN INSULINE VAN SERUMEIWITTEN

Via het slachthuis werd perifeer runderbloed dat afkomstig was van verschillende koeien verkregen. Runderserum met een hoog gehalte aan endogeen insuline werd verkregen door de pancreasvene van een koe na laparotomie onder locale anaesthesie te canuleren*. Het bloed werd opgevangen in centrifugebuizen en gedurende twee uur bij kamertemperatuur bewaard om te stollen. Vervolgens werd het gestolde bloed gedurende 20 minuten bij 2700 rpm gecentrifugeerd, waarna het serum in porties van ± 11 ml werd verdeeld en bij -25°C bewaard.

Om het vermogen van de Sephadexkolommen om exogeen en endogeen insuline van de serumeiwitten te scheiden na te gaan, werden perifeer runderserum waaraan gezuiverd runderinsuline was toegevoegd ($460 \mu\text{E/ml}$) en pancreasveneserum ($213 \mu\text{E/ml}$) gebruikt. Het eluaat werd opgevangen in fracties van ongeveer 3,5 ml en hierin het IRI-gehalte bepaald. Zoals de figuren 4 en 5 laten zien, blijken zowel toegevoegd als endogeen immunoreactief insuline voornamelijk in een duidelijke piek in het klein-moleculaire gebied van het eluaat geconcentreerd te zijn. In beide gevallen werd echter ongeveer 7-10% van het oorspronkelijke IRI-gehalte in de eerste eiwitpiek, die voornamelijk globuline bevatte, geelueerd. Hoewel de nauwkeurigheid van dit percentage in verband met de beperkingen die door de gevoelig-

* Deze operatie werd voor ons verricht door Dr. A.W. Kersjes van de Diergeneeskundige faculteit van de Universiteit te Utrecht.

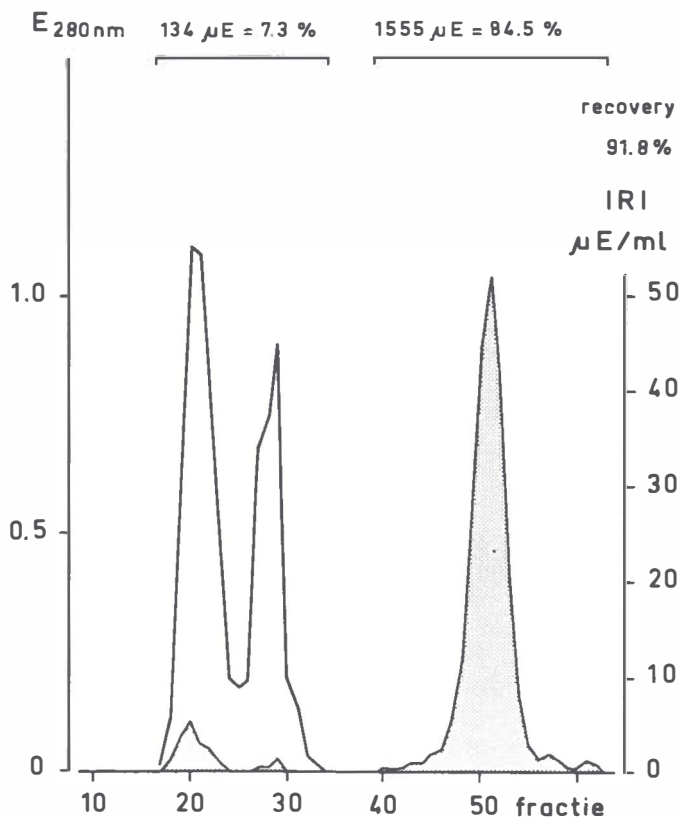


Fig. 4. Elutiepatroon verkregen bij gelfiltratie over Sephadex G-100 van 4 ml runderserum waaraan kristallijn runderinsuline was toegevoegd (460 $\mu\text{E/ml}$). Het grijze gedeelte geeft de verdeling van de immunologisch bepaalbare activiteit weer, de getrokken lijn die van de eiwitten.

heid van de bepaling worden opgelegd betwijfeld mag worden, is het een vrij regelmatig optredend fenomeen (zie b.v. ook fig. 6).

ONDERZOEK VAN SERUMEIWITFRACTIES

Van 11 willekeurige sera werd de immunologische en de biologische activiteit van het serum en de daaruit verkregen eiwitfracties nagegaan.

Om de biologische activiteit van de eiwitfracties te kunnen bepalen werden van 10 sera telkens 2 porties van ieder 5 ml over Se-

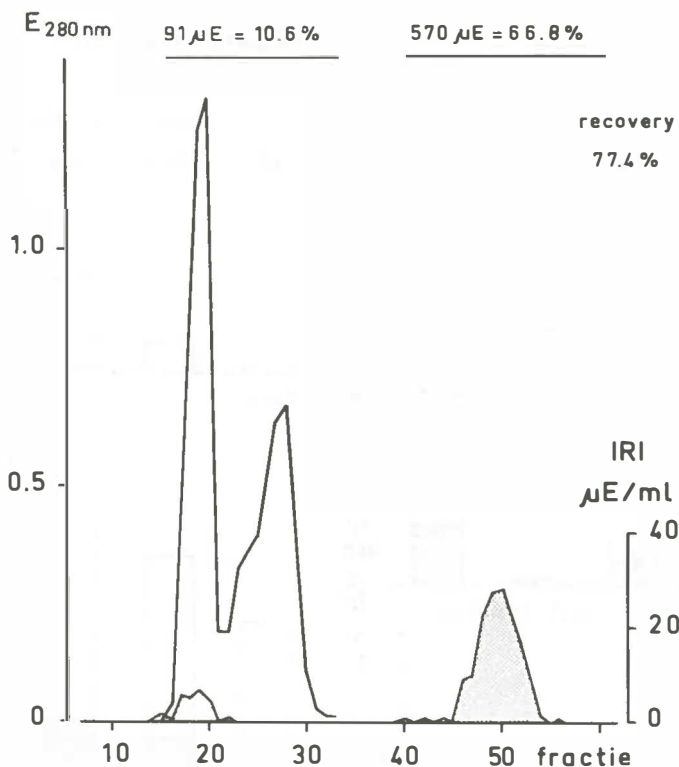


Fig. 5. Elutiepatroon verkregen bij gelfiltratie over Sephadex G-100 van 4 ml pancreas-veneserum met een gehalte van 213 μE endogeen IRI per ml. Het grijze gedeelte geeft de verdeling van de immunologisch bepaalbare activiteit weer, de getrokken lijn die van de eiwitten.

phadex G-100 gescheiden met Krebs-Ringer bicarbonaatbuffer als elutiemiddel. De eluaten van de beide kolommen werden samengevoegd op grond van hun optische dichtheid. Op deze wijze werden de serumeiwitten verdeeld in twee "pools" die voornamelijk globulines resp. albumine bevatten. Tevens werden van alle 11 sera droge eiwitfracties bereid door na gelfiltratie van de sera de beide "pools" droog te vriezen, gedurende 48 uur bij 4°C te dialyseren tegen 5 maal het 25-voudige volume gedemineraliseerd water en vervolgens weer droog te vriezen.

De biologische bepaling met behulp van vetweefsel werd op de in Hoofdstuk IV beschreven wijze uitgevoerd. Alle "onbekenden" werden in een (2 + 1)puntsbepaling getest in afwezigheid en aanwezigheid van een overmaat anti-insulineserum. De sera werden getest in een 4-voudige verdunning. De insu-

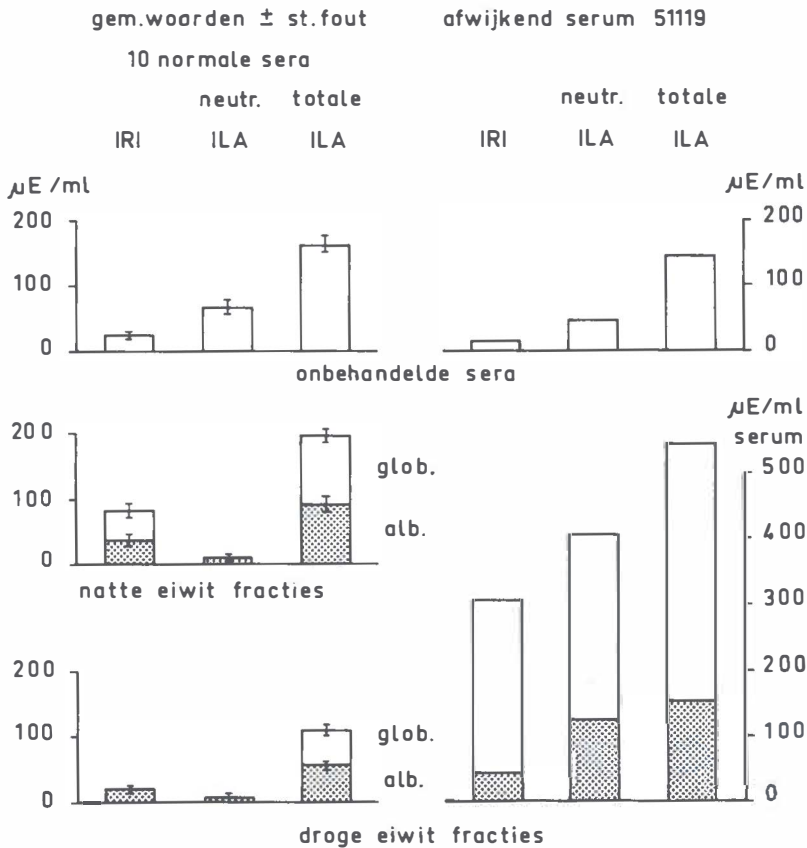


Fig. 6. IRI-gehalte, totale en met anti-insulineserum neutraliseerbare ILA van 11 rundersera en van serumeiwitfracties die verkregen zijn door gelfiltratie over Sephadex G-100. De waarden zijn weergegeven in μE per ml van het oorspronkelijke serum.

line-standaardoplossingen bevatten 1% runderalbumine. De natte eiwitfracties werden als zodanig getest, waarbij de insuline-standaardoplossingen nu 0,25% runderalbumine bevatten. De droge eiwitfracties werden getest in een concentratie van 8 mg per ml. De droge eiwitfracties van serum 51119 werden bovendien nog in een (2 + 2)puntsbepaling getest om paralleliteit met de insuline-standaardlijn aan te tonen.

De immunologische activiteit van de sera en de natte eiwitfracties werden getest in een eindverdunding van 1:10. De eindconcentraties van de droge eiwitfracties varieerden tussen 0,25 en 2,0 mg per ml.

De resultaten van deze 11 sera zijn weergegeven in fig.6. In de 10 sera die in het linkerdeel van de figuur zijn aangeduid als normaal, bedroeg het IRI-gehalte gemiddeld $24 \pm 3,5$ $\mu\text{E/ml}$ (\pm standaardfout). Het totale ILA-gehalte bedroeg 164 ± 14 $\mu\text{E/ml}$ waarvan 67 ± 11 $\mu\text{E/ml}$ met anti-insulineserum geneutraliseerd konden worden.

Om directe vergelijking met de onbehandelde sera mogelijk te maken zijn de activiteiten van de uit deze sera bereide eiwitfracties uitgedrukt per ml oorspronkelijk serum, waarbij is aangenomen dat deze fracties gelijke hoeveelheden eiwit bevatten bij een totaal eiwitgehalte van 65 mg per ml serum. In de drooggevroren globuline- en albuminefracties kon geen IRM of neutraliseerbare ILA worden bepaald. De biologische activiteit was geheel van het niet-neutraliseerbare type. Wanneer de immunologische activiteit van de natte eiwitfracties werd bepaald, werd in de globulinepiek een gemiddelde hoeveelheid van 47 ± 9 $\mu\text{E IRM}$ per ml serum gevonden en in de albuminepiek 36 ± 10 μE per ml.

	$\mu\text{E/mg eiwit}^+$				$\mu\text{E/ml serum}^*$
<i>Globuline fractie</i>	Portie 1	Portie 2	Portie 2	Gemiddeld + st. fout	
0,25 mg/ml ^x	6,8	8,8	9,2		
0,5 mg/ml	8,0	7,8	8,6	$8,0 \pm 0,3$	260 ± 10
1,0 mg/ml	8,6	7,1	7,4		
<i>Albumine fractie</i>					
0,5 mg/ml	--		0,8		
1,0 mg/ml	1,1		2,3	$1,4 \pm 0,3$	46 ± 10
2,0 mg/ml	1,0		2,0		
<i>Globuline + Albumine</i>					306

^x Eindconcentratie in het bepalingssysteem

⁺ Afzonderlijke waarden gebaseerd op bepalingen in 4-voud

^{*} Aangenomen dat het serum 65 mg eiwit per ml bevat, gelijk verdeeld over de beide eiwitfracties

Tabel 1. Radioimmunologisch bepaalde activiteit van droge eiwitpreparaten van serum 51119.

	$\mu\text{E}/\text{mg}$ eiwit		$\mu\text{E}/\text{ml}$ serum*	
<i>Globuline fractie</i>	Totale ILA	Neutr. ILA	Totale ILA	Neutr. ILA
4-punts bep. (portie 1)	11 (8,1-15,2) ^x 14 (10,7-18,6)			
3-punts bep. (portie 2)	8 (4,2-24,3) 15 (10,3-23,5)	6 11		
Gem. \pm st.f.	12 \pm 1,6	8,5	390 \pm 52	276
<i>Albumine fractie</i>				
4-punts bep. (portie 1)	4 (2,6-5,3) 4 (2,5-7,1)			
3-punts bep. (portie 2)	7 (2,6-23,0) 3 (1,9-13,7)	6 2		
Gem. \pm st.f.	4,5 \pm 0,9	4	146 \pm 29	130
<i>Globuline + Albumine</i>			536	406

x 95% betrouwbaarheidsgrenzen

* Aangenomen dat het serum 65 mg eiwit per ml bevat,
gelijk verdeeld over de beide eiwitfracties

Tabel 2. Totale en neutraliseerbare ILA van droge eiwitpreparaten van serum 51119.

De weergave van de resultaten op deze wijze houdt een aanzienlijke extrapolatie van de bepalingresultaten in gezien de verdunning van het serum die optreedt bij de elutie. De minimale hoeveelheid activiteit die op deze manier in de eiwitfracties bepaald kan worden, wordt verkregen door de verdunningsfactor voor iedere eiwitpiek te vermenigvuldigen met de laagste insulineconcentratie die in onze immunologische bepaling nog gedetecteerd kan worden ($0,3 \mu\text{E}/\text{ml}$). Deze bedraagt voor de globulinepiek $20 \mu\text{E}$ per ml serum en voor de albuminefractie $25 \mu\text{E}$ per ml. Als we tevens in aanmerking nemen dat bij 8 van de 10 sera het IRM-gehalte van de globulinepiek hoger was dan de minimaal detecteerbare hoeveelheid, dan zou de gemiddelde activiteit van $47 \pm 9 \mu\text{E}/\text{ml}$ die in deze piek werd gemeten een bepaalbare hoeveelheid IRM vertegenwoordigen. De aanwezigheid van IRM in de albuminepiek is evenwel zeer twijfelachtig, daar de gemiddelde waarde van $36 \pm 10 \mu\text{E}/\text{ml}$ niet hoger is dan de maximale "ruis" van deze piek, die ca $25 \mu\text{E}/\text{ml}$ bedraagt.

Serum 51119

Eén serum (51119) dat, in vergelijking met de tien andere sera, sterk afwijkende resultaten opleverde, werd uitvoeriger getest. De droge eiwitten van dit serum werden in twee afzonderlijke hoeveelheden bereid met behulp van Sephadexkolommen die nog niet eerder gebruikt geweest waren. De eerste portie eiwitten was verkregen uit 20 ml serum, de tweede portie werd twee maanden later bereid uit 60 ml serum. De afzonderlijke

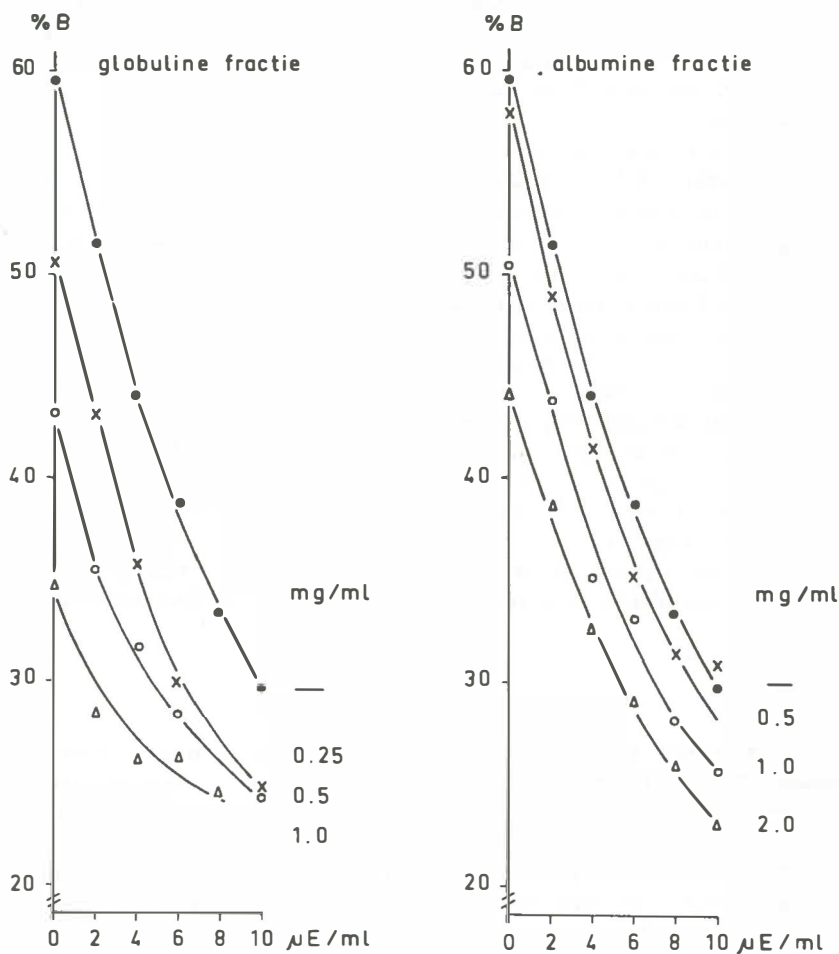


Fig. 7. Radioimmunologisch bepaalde standaardlijnen voor kristallijn runderinsuline in aanwezigheid van verschillende concentraties van de droge eiwitfracties van runder-serum 51119.

resultaten van deze porties zijn weergegeven in de tabellen 1 en 2.

Tabel 1 laat de resultaten zien die verkregen zijn met de radioimmunologische bepaling van de droge eiwitfracties in drie verschillende concentraties. De immunologisch bepaalbare activiteit in de globulinefractie bedroeg gemiddeld $8,0 \pm 0,3 \mu\text{E}$ per mg, de albuminefractie bevatte gemiddeld $1,4 \pm 0,3 \mu\text{E}$ per mg. De mogelijkheid dat deze resultaten een gevolg waren van een niet-specifieke interferentie met de reactie tussen de antilichamen en het gemerkte hormoon werd uitgesloten door de standaardlijnen te bepalen in de aanwezigheid in het bepalingssysteem van verschillende concentraties van de eiwitfracties. In beide gevallen werden parallelle standaardlijnen verkregen (fig. 7).

De activiteiten van de fracties op vetweefsel in vitro zijn vermeld in tabel 2. De totale ILA die zowel in de (2 + 2)- als de (2 + 1)puntsbepaling tweemaal werd gemeten bedroeg voor de globulinefractie $12 \pm 1,6 \mu\text{E}/\text{mg}$ en voor de albuminefractie $4,5 \pm 0,9 \mu\text{E}/\text{mg}$. Van deze activiteit kon resp. 8,5 en 4 $\mu\text{E}/\text{mg}$ met antiserum geneutraliseerd worden. Deze laatste waarden komen goed overeen met de radioimmunologisch bepaalde activiteit. Op grond van deze resultaten kan voor de gecombineerde globuline- en albuminefracties van serum 51119 een immunologisch bepaalbare activiteit van 306 μE per ml serum berekend worden en een neutraliseerbare ILA van 406 μE per ml (fig. 6, rechterzijde). Deze waarden zijn ongeveer een factor 20 resp. 10 hoger dan de in het oorspronkelijke serum bepaalde IRI- en neutraliseerbare ILA-waarden welke resp. 15 $\mu\text{E}/\text{ml}$ en 46 $\mu\text{E}/\text{ml}$ bedroegen. Deze laatste waarden liggen in hetzelfde spreidingsgebied als de andere 10 sera.

DISCUSSIE

Bij filtratie van pancreasveneserum van een koe over Sephadex G-100 werd het grootste deel van het endogene IRI gelueerd als een stof met een kleine mol. massa, vergelijkbaar met toegevoegd gezuiverd insuline. De recovery in deze fractie van 66-85% van het oorspronkelijke IRI is in goede overeenstemming met onderzoeken met pancreasveneserum van een hond na scheiding over Sephadex G-50 (Kajinuma e.m. 1969) en na centrifugeren in de ultracentrifuge van menselijk plasma na een glucosebelasting (Berson & Yalow 1962). Wanneer we bovendien in aanmerking nemen dat de ILA in klein-moleculaire serumfracties met antiserum geneutraliseerd kan

worden (Kipnis & Stein 1964, Gjedde 1968, Kajinuma e.m. 1969), kan er weinig twijfel over bestaan dat in normaal plasma of serum met hoge spiegels aan endogeen IRI, insuline voornamelijk aanwezig is in de vorm van een vrij en relatief klein molecuul dat op basis van zijn grootte van de serum-eiwitten gescheiden kan worden.

Onze eigen resultaten en gegevens uit de literatuur maken het echter zeer twijfelachtig of deze conclusie mag worden geëxtrapoleerd naar sera met lage nuchtere IRI-spiegels. In de natte globulinefracties van 10 willekeurige sera met een IRI-gehalte van $24 \pm 3,5 \mu\text{E}$ per ml werd $47 \pm 9 \mu\text{E}$ IRI per ml serum bepaald. Deze laatste waarde is niet alleen hoger dan de minimaal detecteerbare IRI-spiegel in deze fracties, doch ook hoger dan het IRI-gehalte van het oorspronkelijke serum. Dit is zeer merkwaardig, als men aanneemt dat door de gelfiltratie het kleinmoleculaire IRI van de overige eiwitten gescheiden werd.

Kleine hoeveelheden IRI (7-14 μE /ml serum) in gefiltreerde serum-eiwitfracties zijn ook vermeld door Kajinuma en medewerkers (1969). Aan deze waarneming werd echter, gezien de afwezigheid van neutraliseerbare ILA, geen verdere aandacht geschonken. Dit laatste fenomeen, dat ook bij ons eigen onderzoek werd waargenomen, kan geheel verklaard worden door de betrekkelijke ongevoeligheid en onnauwkeurigheid van de biologische bepaling met behulp van vetweefsel in vergelijking met de radioimmunologische bepaling. In de natte globulinefracties werd een ILA-gehalte gemeten van gemiddeld 18 μE per ml. Bij een gemiddelde λ (precisie-index) van 0,13 ligt de ondergrens van deze waarde bij ongeveer 12 μE per ml (Sheps e.m. 1960, Steinke & Soeldner 1965). Om de neutraliseerbare activiteit nog als zodanig te kunnen bepalen zal zij in dit geval ruim 6 μE per ml natte fractie of 40 μE per ml serum moeten bedragen. De afwezigheid van immunologische reactiviteit in de droge eiwitfracties is minder duidelijk, hoewel deze reeds verklaard kan worden door een vermindering van de activiteit met 30% gedurende de dialyse en droogvriesprocedure. De totale ILA van de droge eiwitfracties is met 50% afgenomen. Yalow en Berson (1960) vermeldden een verlies van 20-60% bij het dialyseren van insuline.

Resultaten die een opvallende overeenkomst vertoonden met de in dit hoofdstuk vermelde resultaten, werden verkregen door Kipnis en Stein (1964). Zij onderzochten 5 humane plasma's met een gemiddeld IRI-gehalte van 42 μE per ml. Na ultracentrifugatie werd in het supernatans 32 μE en in de eiwitlaag nog eens 52 μE IRI per ml gevonden. Ook nu is de vermelde

afwezigheid van neutraliseerbare ILA in deze fractie niet verwonderlijk. De biologische bepalingsmethoden met behulp van vetweefsel laten de meting van neutraliseerbare activiteit die slechts 5% bedraagt van de totale ILA van ongeveer 1100 μ E per ml, zoals in deze fractie gemeten werd, niet toe.

Wij menen dat deze waarnemingen duidelijke aanwijzingen bevatten voor het bestaan van een grootmoleculaire vorm van immunoreactief materiaal in hoeveelheden die gelijk zijn aan het direct bepaalbare IRI-gehalte van nuchter plasma of serum of deze zelfs overtreffen. Daar de stijging van het plasma-insulinegehalte bij een glucosebelasting voornamelijk weerspiegeld wordt in de kleinmoleculaire IRI-fractie (Berson & Yalow 1962, Kajinuma 1969), lijkt de betekenis van grootmoleculair IRM beperkt tot de nuchtere toestand. De mogelijke fysiologische betekenis ervan zal evenwel nog moeten worden aangetoond.

De merkwaardige eigenschappen van het aberrante serum 51119 geven een extra steun aan de gedachten die hierboven zijn uitgedrukt. Terwijl de bepalingen die gedaan zijn met het natieve serum waarden gaven die de waarden van de andere sera dicht benaderden, werd na gelfiltratie in de eiwitfracties 306 μ E IRM per ml serum gemeten waarvan 260 μ E in de globulinefractie. Met de biologische bepalingsmethode werden ongeveer equivalente hoeveelheden neutraliseerbare activiteit in deze fracties gevonden. De validiteit van deze resultaten werd bevestigd door de identieke bepalingsuitkomsten die werden verkregen met twee onafhankelijk van elkaar geïsoleerde hoeveelheden serumeiwitten en extra controle-experimenten. Het lijkt er dus op dat de serumglobulinefractie onder bepaalde omstandigheden werkelijk aanzienlijke hoeveelheden IRM kan bevatten, terwijl de aanwezigheid ervan in natief serum door een of ander mechanisme wordt gemaskeerd.

Gezien de controversionele aard van deze resultaten verdient de mogelijke toevallige contaminatie met kristallijn insuline ernstige aandacht. Theoretisch zou de contaminatie vóór, tijdens of na de isolering van de serumeiwitten hebben kunnen optreden. De eerste van deze mogelijkheden kan worden uitgesloten daar alle bepalingen van het oorspronkelijke serum zijn gedaan na isolering van de tweede portie. Bovendien zou het contaminerend insuline zich gedragen hebben als een stof met een geringere mol. massa (fig. 4). Contaminatie van de Sephadexgel kan eveneens worden uitgesloten, daar nieuw-bereide kolommen werden gebruikt voor de isolering van ieder van de twee porties. Bij contaminatie van de elutiebuffer zou de activiteit evenredig zijn verdeeld over beide eiwitfracties.

Dit was niet het geval. Ten derde, er kan geen aannemelijke reden worden gegeven voor de veronderstelling dat gecontamineerd glaswerk verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de ongelijke verdeling en de reproduceerbaarheid van de contaminatie van de globuline- en albuminefracties van porties van verschillende grootte die met een interval van twee maanden zijn bereid.

De duidelijke aanwezigheid van een gemaskeerde vorm van grootmoleculair IRM in serum 51119 roept vele vragen op welke nog niet beantwoord kunnen worden. Het vrijkomen van deze activiteit geschiedde gedurende de gelfiltratie of een van de volgende stappen tijdens de bereiding, zoals vriesdrogen of dialyse tegen water. De resultaten van de bepaling met behulp van vetweefsel suggereren dat de grootmoleculaire activiteit in de natieve vorm niet biologisch actief was. Een afdoend bewijs hiervoor ontbreekt echter, daar het oorspronkelijke serum niet getest is op insuline-antagonerende werking op vetweefsel. De aanwezigheid in dit serum van een neutraliserend immuunglobuline kan echter worden uitgesloten, daar het gemerkte runderinsuline in het immunologische bepalingssysteem geen complex vormde met de serumeiwitten in afwezigheid van anti-insulineserum. In dit verband kan het relevant zijn dat met antiserum neutraliseerbare ILA is waargenomen in serumglobulinefracties die verkregen waren door gelfiltratie over Sephadex G-200, nadat deze gedurende 48 uur bij 37°C tegen 1 mM CaCl_2 bij pH 7,7-8,1 gedialyseerd waren (Gjedde 1968).

Er kan weinig gezegd worden over de aard van het grootmoleculaire IRM in serum. Daar het materiaal in de globulinefractie voorkomt, heeft het een mol. massa van minimaal 100.000 en lijkt de aanwezigheid van insulinepolymeren of pro-insuline zeer onwaarschijnlijk. De meest voor de hand liggende verklaring lijkt daarom dat de activiteit zetelt in een eiwitcomplex. Het bestaan van een eiwit-gebonden vorm van insuline in serum is reeds door Antoniades en medewerkers (1962) gepostuleerd, doch de experimentele bewijzen hiervoor zijn aan hevige kritiek onderworpen geweest (Berson & Yalow 1964, Kipnis & Stein 1964, Berson & Yalow 1965, Yalow & Berson 1967, Meade e.m. 1968). Pogingen om de aanwezigheid van IRI in serumfracties die bereid waren met behulp van een ionenwisselaar volgens de methode van Antoniades aan te tonen, hebben tot nu toe geen resultaat gehad. Dit argument kan niet worden aangevoerd tegen de door ons gevonden grootmoleculaire activiteit. De activiteit in serum 51119 blijkt te voldoen aan de drie criteria voor endogeen insuline, zoals wij die in Hoofdstuk III hebben geformuleerd.

De oorzaak die aan de aberrante eigenschappen van serum 51119 ten grondslag ligt, blijft duister. In verband met de gesuggereerde aanwezigheid van geringe hoeveelheden grootmoleculair IRMin willekeurige sera is het verleidelijk te speculeren dat het verschil voornamelijk kwantitatief was en dus een wat overdreven beeld van een in de grond normaal patroon geeft. Of dit een mogelijk gevolg is van een pathologische toestand blijft op gissingen berusten, daar verdere gegevens van de koe waarvan serum 51119 afkomstig is ontbreken.

HOOFDSTUK VI

VORMING EN DISSOCIATIE VAN EEN GROOTMOLECULAIR INSULINECOMPLEX

In het vorige hoofdstuk werd de vondst beschreven van een runderserum, waarvan de globulinefractie relatief grote hoeveelheden bevatte van een substantie, die volgens de in Hoofdstuk III geformuleerde biologische en immunologische criteria niet van insuline te onderscheiden was. Aangezien de aanwezigheid van dit materiaal in het onbewerkte serum gemaskeerd bleek te zijn, verschaffen deze resultaten een sterke aanwijzing dat binding van insuline aan serumeiwitten inderdaad mogelijk is.

Het verdere onderzoek werd belemmerd door het feit dat het genoemde verschijnsel in deze omvang slechts éénmaal werd waargenomen, terwijl het betreffende serum wegens de beperkte beschikbare hoeveelheid niet uitvoeriger onderzocht kon worden. In de overige onderzochte sera konden in de natte globulinefracties slechts op de grens van de meetgevoeligheid liggende hoeveelheden immunoreactief materiaal worden aangetoond. Deze hoeveelheden waren te gering om ook met biologische bepalingsmethoden gedetecteerd te kunnen worden, zodat in deze gevallen niet aan de reeds genoemde criteria voor identiteit met insuline voldaan kon worden.

Om deze redenen werd besloten te onderzoeken of door incubatie van willekeurige normale rundersera met toegevoegd runderinsuline, meetbare insulineactiviteit in de serumeiwitfracties gegenereerd zou kunnen worden. Bij de opzet van deze proeven werd uitgegaan van de volgende overwegingen. Het is een bekend feit dat, wanneer $[^{131}\text{I}]$ insuline aan serum wordt toegevoegd, een geringe hoeveelheid radioactiviteit zich aan de serumeiwitten hecht. Volgens Berson en medewerkers (1956) berust dit verschijnsel op binding van beschadigd $[^{131}\text{I}]$ insuline aan serumeiwitten. Deze beschadigde fractie van het gemerkte insuline zou bovendien niet meer immunologisch reactief zijn (Yalow & Berson 1960).

Uit eigen waarnemingen is echter gebleken dat een deel van de aan eiwit gebonden radioactiviteit, die volgens de criteria van Yalow en Berson als "beschadigd" moet worden aangeduid, wel degelijk met tegen insuline gerichte antilichamen kan reageren. Wij vroegen ons daarom af of een lichte beschadiging of

verandering van het insulinemolecuul die de immunologische en biologische eigenschappen van het molecuul niet of nauwelijks aantast, gepaard zou kunnen gaan met het optreden van binding aan serumeiwitten. Teneinde het eventueel ontstaan van een dergelijk complex zowel met immunologische als biologische bepalingsmethoden te kunnen onderzoeken, werd besloten de experimenten met een relatief grote hoeveelheid niet-gemerkt insuline uit te voeren.

Als beschadigend systeem werd leverhomogenaat gekozen op grond van het feit dat lever rijk is aan insuline-afbrekende enzymactiviteit, die ook fysiologisch van betekenis lijkt te zijn. Verschillende onderzoeken hebben aangetoond dat ongeveer de helft van het insuline dat via de portale circulatie de lever binnenstroomt, door dit orgaan verwijderd en afgebroken wordt (Madison e.m. 1959, Mortimore e.m. 1959). Bij de opzet van het experiment werd gestreeft naar een zodanige verhouding van afbrekende activiteit en toegevoegd substraat, dat een gelijktijdig toegevoegde speurdosis [^{131}I]insuline slechts gedeeltelijk tot kleine radioactieve fragmenten zou worden afgebroken.

GENERATIE VAN EEN GROOTMOLECULAIR INSULINECOMPLEX

Incubatie van serum en insuline met leverhomogenaat

Leverhomogenaat werd verkregen door 1 gram lever (afkomstig van 4 ratten) te homogeniseren in 10 ml Krebs-Ringer bicarbonaatbuffer. Vervolgens werd gedurende 15 minuten bij 4°C op 30.000 x g gecentrifugeerd. Het supernatans, dat insuline-degraderende activiteit bevatte, werd gebruikt voor de experimenten.

Aan 5 ml runderserum werd 0,5 ml leverhomogenaat, 0,5 ml [^{131}I]insulineoplossing ($\pm 350 \mu\text{E}$ per ml veronalbuffer pH 8,5) en 0,250 ml niet-gemerkt insuline (25 E per ml zure aqua dem. pH 2-3) toegevoegd. De eindconcentratie van het insuline bedroeg 1 E/ml ($\approx 7 \mu\text{M}$). Parallel hieraan werd aan 5 ml van hetzelfde serum 0,5 ml leverhomogenaat, 0,5 ml [^{131}I]insulineoplossing en 0,250 ml zure aqua dem. toegevoegd. De diverse media waren vooraf op 4°C gekoeld. De beide mengsels werden gedurende 30 minuten bij 37°C in een Dubnoff-incubatiebad geïncubeerd, waarna van ieder der geïncubeerde mengsels 5 ml bij 4°C over Sephadex G-100 werd gescheiden. Om de degradatie van insuline na te gaan, werden de fracties behandeld met trichloorazijnzuur (TCA). Intact insuline precipiteert in 5% TCA, insulinebrokstukken blijven onder deze omstandigheden in oplossing. De hoeveelheid oplosbare radioactiviteit is dus een maat voor insulinedegradatie.

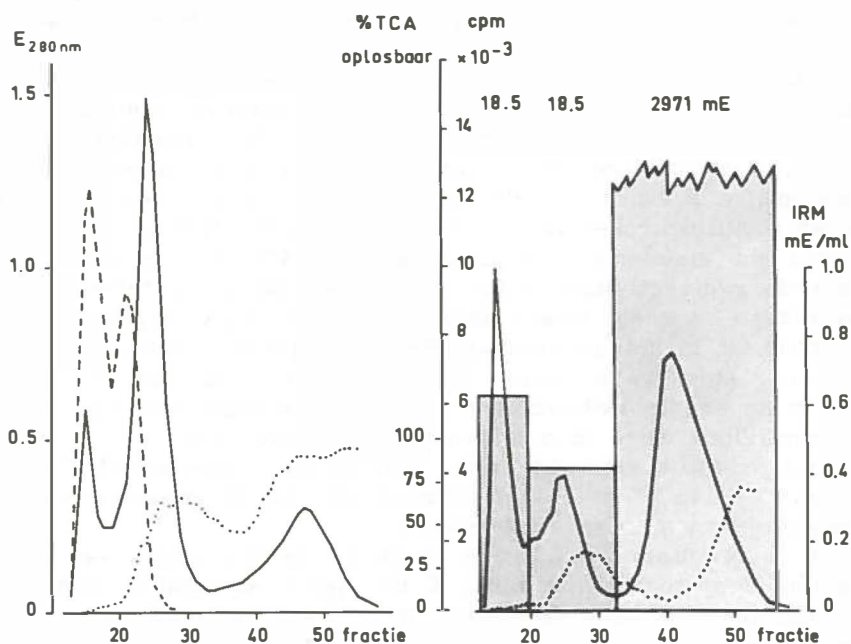


Fig. 8. Elutiepatronen verkregen bij gelfiltratie over Sephadex G-100 na incubatie van runderserum, leverhomogenaat en een "tracer"-hoeveelheid $[^{131}\text{I}]$ insuline (links) en van een gelijksoortig systeem dat bovendien nog 1 E runderinsuline per ml bevatte (rechts). De grijze blokken geven het insulinegehalte in de samengevoegde fracties weer. --- extinctie; — radioactiviteit; TCA.

In het linkerdeel van fig. 8 is het patroon weergegeven, zoals dit werd verkregen bij de filtratie van het incubatiemedium waaraan geen extra insuline was toegevoegd. De radioactiviteit die geëluëerd werd in de fracties 13 t/m 33, het globuline-, albumine- en postalbuminegebied, was op het tijdstip van de scheiding gebonden aan materiaal dat aanzienlijk groter was dan het oorspronkelijke $[^{131}\text{I}]$ insulinemolecuul. Waarschijnlijk is dit veroorzaakt door gemodificeerd $[^{131}\text{I}]$ insuline c.q. $[^{131}\text{I}]$ insulinebrokstukken die zich aan eiwit hebben gehecht. In het gebied waar bij afwezigheid van leverhomogenaat onbeschadigd $[^{131}\text{I}]$ insuline geëluëerd wordt, fractie 35-45, werd nu relatief weinig radioactiviteit gevonden. De radioactiviteit die geëluëerd werd na fractie 45, bestond voornamelijk uit radioactieve fragmenten van het $[^{131}\text{I}]$ insuline. Het TCA-patroon laat duidelijk zien dat het grootste deel van de radioactiviteit oplosbaar was in 5% trichloorazijnzuur. Uit deze resultaten blijkt dat bij incubatie van een

speurdosis [^{131}I]insuline in runderserum met leverhomogenaat een aanzienlijke degradatie van het radioactieve hormoon optreedt.

In het rechter deel van fig. 8 is het scheidingspatroon weergegeven van het incubatiemedium dat niet-gemerkt insuline bevatte in een concentratie van 1 E per ml. De aanwezigheid van niet-gemerkt insuline in het incubatiemengsel veroorzaakte een aanzienlijke reductie van de radioactiviteit in het gebied na fractie 45 (insulinebrokstukken). Ook de radioactiviteit in het eiwitgebied was afgenomen. In dit geval werd 43% van de totale geëluëerde radioactiviteit in het eiwitgebied gemeten, terwijl dit percentage voor het linker deel van fig. 8 73% bedroeg. De radioactiviteit in het albumine-postalbuminegebied (fractie 20-29) was zeer sterk verminderd, terwijl er een duidelijke toename was in de eerste radioactieve piek. Het grootste deel van de radioactiviteit werd in het insulinegebied gevonden. De TCA-curve laat duidelijk zien dat er nu veel minder radioactiviteit oplosbaar was in 5% trichloorazijnzuur dan bij de incubatie in afwezigheid van niet-gemerkt insuline.

Uit de resultaten van fig. 8 blijkt dat de degradatie van [^{131}I]insuline door toevoeging van 1 E niet-gemerkt insuline per ml incubatiemedium voor een groot deel, doch niet volledig is geremd. Aangenomen mag worden dat er onder deze omstandigheden ook enige afbraak c.q. modificatie van het toegevoegde niet-gemerkte insuline heeft plaatsgehad.

Het eluaat van het rechterdeel van fig. 8 werd samengevoegd zoals aangegeven in de figuur en de insuline-activiteit hierin radioimmunologisch bepaald. Van de 5000 mE insuline die oorspronkelijk in het op de Sephadexkolom gebrachte incubatiemedium aanwezig waren werden 2971 mE in het insulinegebied teruggevonden. In het albuminegebied werden 18,5 mE gemeten, terwijl in het globulinegebied eveneens 18,5 mE IRM bepaald werden. De totale "recovery" bedroeg 60,2% van het oorspronkelijk toegevoegde insuline. Van de in totaal van de kolom geëluëerde activiteit werd 0,6% als grootmoleculair IRM in het globulinegebied bepaald.

De resultaten laten zien dat in het gebruikte systeem grootmoleculair materiaal gevormd is dat in het radioimmunologisch bepalingssysteem voor insuline gemeten kon worden. Zij geven echter geen informatie of dit een gevolg is van de aanwezigheid van leverhomogenaat in het incubatiemedium, van de aanwezigheid van serum dan wel van beide.

Het belang van de aanwezigheid van serum voor de vorming van grootmoleculair IRM blijkt uit de resultaten die zijn weerge-

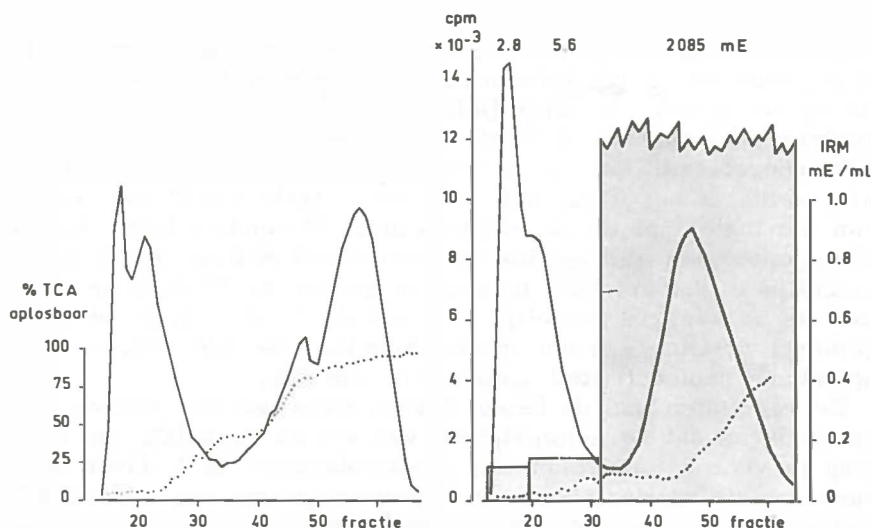


Fig. 9. Elutiepatronen verkregen bij gelfiltratie over Sephadex G-100 na incubatie van Krebs-Ringer buffer, leverhomogenaat en een "tracer"-hoeveelheid $[^{131}\text{I}]$ insuline (links) en van een gelijksoortig systeem dat bovendien nog 1 E runderinsuline per ml bevatte. De grijze blokken geven het insulinegehalte in de samengevoegde fracties weer. — radioactiviteit; TCA.

geven in fig. 9. De opzet van dit experiment komt overeen met die van fig. 8, met alleen dit verschil dat het runderserum nu vervangen was door Krebs-Ringer bicarbonaatbuffer waarin 0,025% runderalbumine was opgelost.

Het linker deel van fig. 9 laat zien dat het $[^{131}\text{I}]$ insuline vrijwel volledig is afgebroken. Het grootste deel van de radioactiviteit was oplosbaar in 5% TCA en werd gevonden in het gebied van de kleine insulinebrokstukken. In het rechter deel van fig. 9 is het scheidingspatroon weergegeven voor het geval dat aan het incubatiemedium niet-gemerkt insuline was toegevoegd. Het merendeel van de radioactiviteit verscheen nu op de plaats waar $[^{131}\text{I}]$ insuline geëluëerd wordt, doch ook in het globulinegebied werd een duidelijke radioactieve piek waargenomen. De radioactiviteit in het eiwitgebied bedroeg nu 45% van het totaal, voor het linkerdeel van fig. 9 was dit 37%.

De fracties werden samengevoegd zoals aangegeven in de figuur en het immunologisch reactief insuline in deze "pools" bepaald. In het globulinegebied werd 2,8 mE IRM aangetoond, in het albuminegebied 5,6 mE en in het insulinegebied 2085 mE. In totaal kon in het eluaat slechts 42% van het oorspronkelijk aan het incubatiemedium toegevoegde insuline (5000 mE) worden bepaald. Van de in totaal van de kolom geëluëerde activiteit

werd 0,13% in het globulinegebied aangetoond, berekend op de oorspronkelijk in het incubatiemedium aanwezige activiteit bedroeg het 0,06%. In vergelijking met de globulinepiek in het rechter deel van fig. 8 werd slechts weinig grootmoleculair IRM aangetoond. Het is nu evenwel geen echte piek, zodat we niet weten of het misschien niet veroorzaakt wordt door overlap van het materiaal uit de albuminepiek. Bovendien bevat leverhomogenaat een geringe hoeveelheid bloedeiwitten, zodat het ook mogelijk is dat het IRM hieraan is gebonden. Evenals in fig. 8 laat de TCA-curve duidelijk zien dat door toevoeging van niet-gemerkt insuline aan het incubatiemedium de hoeveelheid TCA-oplosbare radioactiviteit aanzienlijk afneemt.

De resultaten van de beide figuren samenvattend kunnen we concluderen dat de aanwezigheid van serum kennelijk van belang is voor het ontstaan van grootmoleculair IRM. Over de noodzaak van de aanwezigheid van leverhomogenaat voor de vorming van grootmoleculair IRM geven deze experimenten geen uitsluitsel. Wel mag worden aangenomen dat het leverhomogenaat ook in aanwezigheid van een overmaat niet-gemerkt insuline afbraak van het hormoon heeft veroorzaakt. Dit is overeenkomstig hetgeen bij de opzet van deze reeks experimenten werd nagestreefd.

Na incubatie van serum en insuline met leverhomogenaat kon zowel in het globuline- als het albuminegebied radioimmunologisch bepaalde activiteit worden aangetoond. Uit bepalingen van de afzonderlijke fracties van het eluaat is echter gebleken dat de radioimmunologisch bepaalde insulinepiek eerder begint dan de [^{131}I]insulinepiek. Daar de indeling in "pools" op grond van het radioactiviteitspatroon geschiedde, zal een deel van de in het albuminegebied bepaalde activiteit veroorzaakt zijn door contaminatie met het stijgende deel van de insulinepiek. Eén of twee fracties meer of minder in de albuminepool kan reeds een verschil van enkele mE (tot zelfs 10 mE) veroorzaken. Hoewel er in het albuminegebied wel enig insulinecomplex voorkomt kan deze, door het wisselend gehalte aan vrij insuline, niet met de door ons gebruikte methode gekwantificeerd worden. Om deze reden zal de albuminefractie verder buiten beschouwing gelaten worden.

IMMUNOLOGISCHE EN BIOLOGISCHE EIGENSCHAPPEN VAN HET COMPLEX

Teneinde het gegenereerde grootmoleculaire immunoreactieve materiaal als insuline te kunnen bestempelen, dient dit materiaal eveneens te voldoen aan de in Hoofdstuk III geformuleerde criteria betreffende biologische activiteit en neutraliseerbaarheid

van deze activiteit met tegen insuline gerichte antisera. Om dit na te gaan werden de eiwitfracties van met insuline geïncubeerde sera drooggevroren, gedialyseerd tegen gedemineraliseerd water en vervolgens weer drooggevroren. De droge eiwitfracties werden in verschillende biologische bepalingssystemen onderzocht.

Epididymisvetweefsel in vitro

De bepalingsmethode is uitvoerig in Hoofdstuk IV beschreven. In de (2 + 2)puntsbepaling werd het grootmoleculaire materiaal getest in concentraties van 0,5 en 2 mg per ml, bij de (2 + 1)puntsbepaling bedroeg de concentratie 1 mg per ml. Het effect van iedere concentratie werd in 5-voud bepaald.

De resultaten van de biologische bepalingen zijn met hun 95% betrouwbaarheidsintervallen weergegeven in tabel 3. De (2 + 2)-

	IRM	(2+1)puntsbepaling		(2+2)p
		neutr. ILA	totale ILA	totale ILA
$\mu\text{E}/\text{mg}$ eiwit	105	128	128 (97-174)	99 (63-193)

Tabel 3. Biologische en immunologische activiteit van de globulinefractie verkregen uit runderserum dat geïncubeerd was met leverhomogenaat in aanwezigheid van toegevoegd runderinsuline.

puntsbepaling voldeed aan het in Hoofdstuk III gestelde 2e criterium, de regressielijnen voor de insulinestandaard en het grootmoleculaire materiaal liepen parallel. Met de (2 + 1)puntsbepalingen werd tevens voldaan aan het 3e criterium, nl. dat de biologische activiteit van het materiaal met tegen insuline gericht antiserum onderdrukt moet kunnen worden. Met de (2 + 2)puntsbepaling werd in de globulinefractie een totale ILA van 99 $\mu\text{E}/\text{mg}$ aangetoond ($\lambda = 0,18$), met de (2 + 1)puntsbepaling werd een totale ILA gemeten van 128 $\mu\text{E}/\text{mg}$, welke activiteit volledig met antiserum geneutraliseerd kon worden ($\lambda = 0,09$), terwijl radioimmunologisch een activiteit van 105 μE per mg eiwit werd bepaald. De biologische en de immunologische activiteit van het grootmoleculaire IRM komen dus goed overeen.

Diafragma in vitro

Insuline stimuleert niet alleen de glucoseopname van vetweef-

sel, maar doet dit ook op spierweefsel. We hebben hiervan gebruik gemaakt om de invloed van het gegenereerde grootmoleculaire IRM op de glucoseopname van het geïsoleerde rattediafragma na te gaan. De opzet van het experiment was er niet op gericht de insulineactiviteit van het grootmoleculaire materiaal kwantitatief te bepalen, doch was slechts bedoeld om tot een kwalitatieve uitspraak betreffende het preparaat te kunnen komen.

De proef werd op de in Hoofdstuk IV beschreven wijze uitgevoerd. De globulinefracties die verkregen waren van serum dat geïncubeerd was met leverhomogenaat in afwezigheid resp. aanwezigheid van toegevoegd niet-gemerkt insuline, werden getest in een concentratie van 5 mg/ml. De globulinefractie van het met insuline geïncubeerde serum bevatte 250 μ E IRM per ml.

Fig. 10 laat zien dat het globuline-eiwit van serum dat met

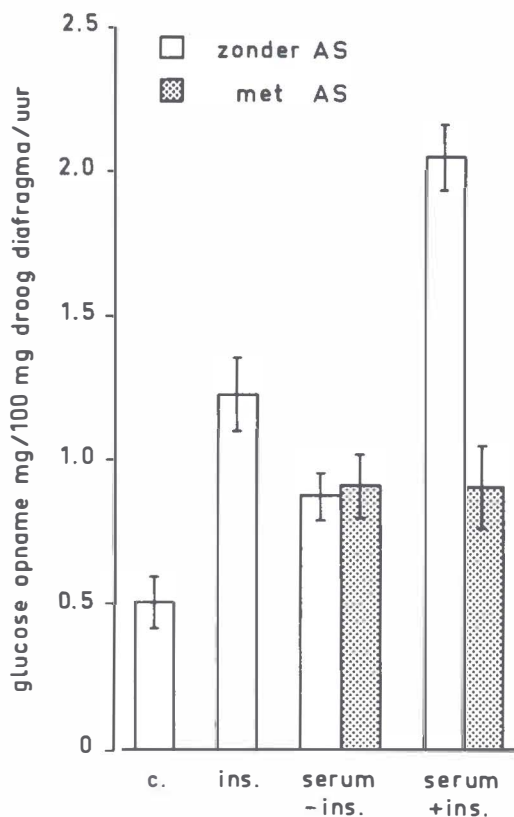


Fig. 10. Effect van globuline-eiwit op de glucoseopname van rattediafragma's in vitro. c = ongestimuleerde opname; ins. = opname o.i.v. 200 μ E insuline; serum - ins. = serum geïncubeerd in afwezigheid van insuline; serum + ins. = serum geïncubeerd in aanwezigheid van toegevoegd insuline. Resultaten weergegeven \pm standaard fout.

leverhomogenaat in afwezigheid van insuline geïncubeerd was de glucoseopname reeds stimuleerde. Dit effect kon echter niet met anti-insulineserum geneutraliseerd worden. Het globuline-eiwit dat verkregen was uit serum dat in aanwezigheid van toegevoegd insuline was geïncubeerd, stimuleerde de glucoseopname van diafragmaweefsel aanzienlijk. Deze gestimuleerde glucoseopname kon met antiserum worden teruggebracht tot het niveau van het controleglobuline.

Het gegenereerde grootmoleculaire IRM is dus ook op diafragmaweefsel aantoonbaar. De biologische activiteit blijkt ook nu geheel van het neutraliseerbare type te zijn.

Invloed op het glucosemetabolisme in vivo

Insuline heeft een stimulerend effect op de glucoseopname door vetweefsel en diafragma in vitro. Minstens even kenmerkend voor dit hormoon is de invloed die het heeft op de verdere metabole omzetting van het opgenomen glucose in deze weefsels, het verhoogt de omzetting van glucose tot glycogeen (vooral in spierweefsel) en tot vetzuren en triglyceriden (vooral in vetweefsel). Deze laatste aspecten van de insulinewerking werden voor het gegenereerde grootmoleculaire IRM onderzocht met behulp van de in vivo methode volgens Rafaelsen en medewerkers (1965) en Young (1967), waarbij gebruik gemaakt werd van $[U-^{14}C]$ -glucose. De wijze waarop het experiment werd uitgevoerd is vermeld in Hoofdstuk IV. Aan de controledieren werd 1000 μE runderinsuline toegediend. De testdieren kregen globuline-eiwit toegediend die een equivalente hoeveelheid rechtstreeks meetbaar IRM bevatte.

Fig. 11 laat zien dat de omzetting van $[^{14}C]$ glucose in spierglycogeen, vetweefselglycogeen en totaal lipoid in vetweefsel door grootmoleculair IRM werd bevorderd. Het waargenomen verschil in effect ten opzichte van insuline was niet significant. Door zowel het insuline als het globulinepreparaat voorafgaande aan de toediening gedurende 30 minuten aan een overmaat anti-insulineserum bloot te stellen werd in beide gevallen de stimulatie van de glucosestofwisseling tot hetzelfde niveau gereduceerd.

Het grootmoleculaire IRM is dus ook wat stimulering van de metabole omzetting van glucose betreft niet van insuline te onderscheiden.

De resultaten van de experimenten samenvattend kunnen we concluderen dat gegenereerd grootmoleculair IRM globaal genomen zowel kwalitatief als kwantitatief de biologische activiteit heeft die op grond van de radioimmunologische bepaling verwacht mag worden. Alle onderzochte biologische effecten zijn kwalitatief

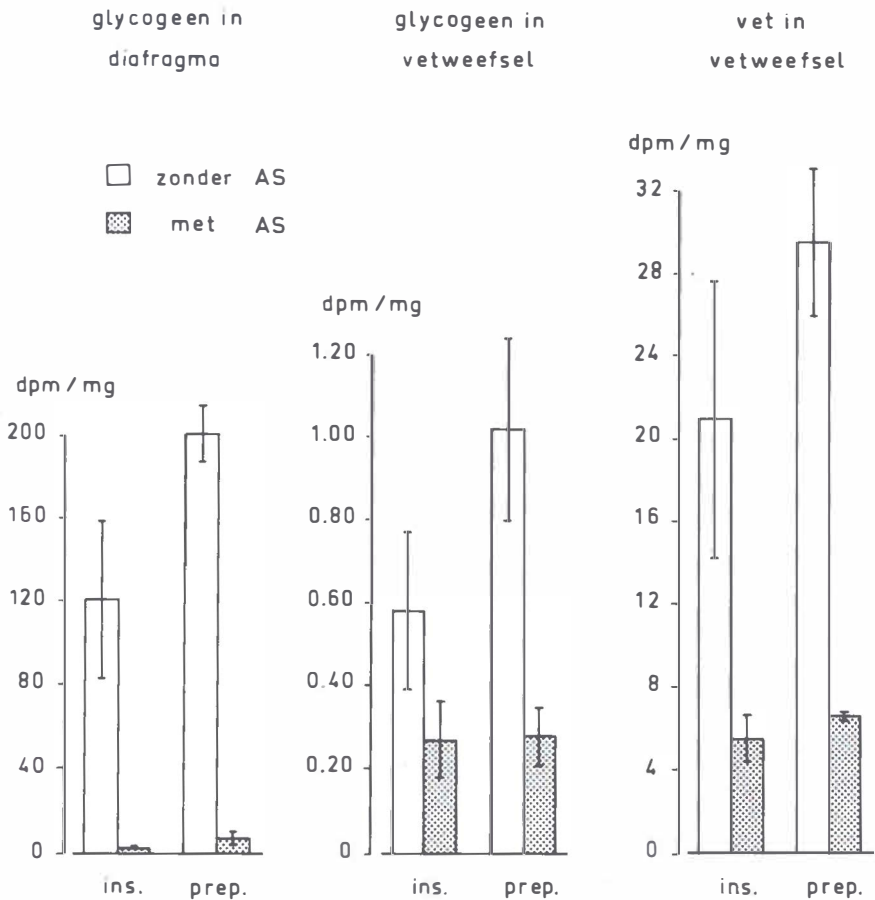


Fig. 11. Effect van globuline-eiwit, afkomstig van met insuline geïncubeerd runderserum, op de incorporatie van $[U-^{14}C]$ glucose in glycogeen in diafragma en vetweefsel en vet in vetweefsel. Resultaten weergegeven \pm standaard fout.

gelijk aan die van insuline en kunnen met anti-insulineserum volledig worden geneutraliseerd.

Hiermee is vrijwel bewezen dat insuline onder de gekozen omstandigheden met een of andere serumcomponent een grootmoleculair complex kan vormen. De modificatie die eventueel in het insulinemolecuul is opgetreden, is waarschijnlijk zeer gering, daar zowel de biologische als de immunologische activiteit van het hormoon nog steeds in het complex aanwezig zijn. Het is niet bewezen dat de serumcomponent een eiwit zou zijn, maar dit is wel waarschijnlijk.

COMPLEXVORMING IN AFWEZIGHEID VAN LEVERHOMOGENAAT EN TEMPERATUURAFHANKELIJKHEID

Bij de generatie van grootmoleculaire activiteit, zoals deze beschreven is in de eerste paragraaf van dit hoofdstuk, werd uitgegaan van de veronderstelling dat lichte enzymatische modificatie van het toegevoegde insuline nodig zou zijn voor de vorming van een eventueel complex. De juistheid van deze veronderstelling werd in verdere proeven nader getoetst.

Aan 5 ml runderserum werd 0,5 ml Krebs-Ringer bicarbonaatbuffer of 0,5 ml leverhomogenaat, 0,5 ml [^{131}I]insulineoplossing en 0,250 ml niet-gemerkt insuline (25 E per ml zure aqua dem. pH 2-3) toegevoegd. De verschillende oplossingen waren vóór het mengen tot 0°C gekoeld. De mengsels werden gedurende 30 minuten bij 37°C geïncubeerd en vervolgens over Sephadex G-100 gescheiden. Vier verschillende rundersera werden op deze wijze getest. De incubaties werden niet parallel uitgevoerd. De in de fracties gevonden activiteit is weergegeven in mE per ml serum. Berekening per mg eiwit was niet goed mogelijk, daar het materiaal niet werd drooggevroren, doch de activiteit in de samengevoegde kolomfracties direct als zodanig radioimmunologisch bepaald werd.

Wanneer tijdens de incubatie in het medium leverhomogenaat aanwezig was, werd in de globulinefractie gemiddeld 6,1 mE IRM per ml serum gemeten. Hoewel lager, was de gemiddelde grootmoleculaire activiteit die in afwezigheid van leverhomogenaat gegenereerd kon worden toch nog 4,6 mE per ml serum (tabel 4, bovenste 2 regels). Het verschil is echter niet significant ($p > 0,05$). Hieruit blijkt dat de aanwezigheid van leverho-

	mE/ml serum
30 min. incubatie 37°C samen met homogenaat	6,1 ± 0,7* (4) ⁺
30 min. incubatie 37°C	4,6 ± 0,2 (4)
30 min. incubatie 0°C	2,2 ± 0,1 (4)
0 min. incubatie 0°C	2,3 ± 0,3 (4)
15 min. verwarmd 60°C 30 min. incubatie 37°C	48,8 ± 3,6 (6)

* standaardfout

+ aantal sera

Tabel 4. Immunoreactiviteit van de globulinefractie na incubatie van rundersera met run-
derinsuline onder verschillende omstandigheden.

mogenaat in het incubatiesysteem het ontstaan van het grootmoleculaire insulinecomplex misschien in lichte mate kan bevorderen, maar onmisbaar voor de complexvorming is leverhomogenaat in ieder geval niet.

Hierop komt de vraag naar voren welke factoren dan mogelijk een rol spelen bij de vorming van een grootmoleculair insulinecomplex.

Serum-insulinemengsels werden als boven beschreven, zonder toevoeging van leverhomogenaat, bij 0°C bereid. De mengsels werden gedurende 30 minuten bij 0°C geïncubeerd en daarna gescheiden, of onmiddellijk na het mengen op de Sephadex G-100 kolom gebracht. Dezelfde vier sera als bij het vorige experiment zijn gebruikt. Wanneer de tweede en derde regel van tabel 4 met elkaar vergeleken worden, blijkt dat bij gelijkblijvende incubatieduur verlaging van de temperatuur een significante vermindering van de in de globulinefractie bepaalde immunoreactiviteit tot gevolg heeft, nl. $4,6 \pm 0,2$ mE per ml serum bij 37°C en $2,2 \pm 0,1$ mE bij 0°C ($p < 0,001$). Verkorting van de incubatieduur tot het minimum heeft geen verdere vermindering van de activiteit in de globulinefractie tot gevolg (tabel 4, regel 4).

Hoewel in mindere mate dan bij 37°C, treedt de complexvorming ook nog bij 0°C op en is dan zelfs onafhankelijk van de incubatieduur (tot 30 minuten). Het complex wordt dus bij 0°C vrijwel onmiddellijk gevormd.

De resultaten die zijn weergegeven in de tweede en derde regel van tabel 4 zouden eventueel nog kunnen berusten op een in serum aanwezige enzymatische factor die ook bij 0°C nog actief is. We hebben deze mogelijkheid willen onderzoeken door het serum, voorafgaande aan de incubatie met insuline, op 60°C te verwarmen met de bedoeling hierdoor eventuele enzymactiviteit te remmen.

Runderserum werd gedurende 15 minuten op 60°C verwarmd. Vervolgens werd afgekoeld tot 0°C waarna een serum-insulinemengsel zonder toevoeging van leverhomogenaat werd bereid zoals boven aangegeven. Het mengsel werd gedurende 30 minuten bij 37°C geïncubeerd en vervolgens over Sephadex G-100 gescheiden. De fracties van het globulinegebied werden gecombineerd en de hoeveelheid IRM hierin bepaald. Op deze wijze zijn 6 sera, waarvan 2 ook bij de voorgaande experimenten gebruikt waren, getest. De waarden zijn berekend per ml serum en weergegeven in tabel 4, regel 5.

In de globulinefractie werd een gemiddelde activiteit van 48,8 mE per ml serum gevonden, een waarde die ongeveer 10 x hoger is dan wanneer het serum onder overigens gelijke omstandigheden niet vooraf op 37°C verwarmd was geweest.

Het blijkt dus dat door voorafgaande verwarming van het serum aanzienlijk meer grootmoleculair insulinecomplex gevormd werd. Dit pleit tegen een in serum aanwezig enzym dat de complexvorming zou bevorderen. Deze mogelijkheid kan echter niet volledig worden uitgesloten, doch dan zal het enzym warmtesta-
biel moeten zijn.

Vervolgens hebben we nagegaan of de complexvorming mogelijk een gevolg is van veranderingen die in serum zouden kunnen optreden door het invriezen, bewaren en ontdooien ervan. Vijf ml vers runderserum werd 5-6 uur na het verzamelen van het bloed gemengd met 0,4 ml [^{131}I]insulineoplossing en 0,225 ml van een oplossing die 25 E runderinsuline per ml bevatte. Het mengsel werd gedurende 30 minuten bij 37°C geïncubeerd waarna 5 ml incubaat over Sephadex G-100 werd gescheiden. Nadat het serum gedurende 7 dagen bij -25°C bewaard was, werden 5 ml ervan op overeenkomstige wijze behandeld. Het effect van invriezen, opslag en ontdooien werd voor 3 sera nagegaan.

	vers	7 dagen	verschil
serum 90826	4,1	3,9	-0,2
90902	4,8	3,9	-0,9
90909	3,4	3,1	-0,3
gemiddeld	4,1 ± 0,43	3,6 ± 0,27	-0,5 ± 0,22

Tabel 5. Generatie van grootmoleculair IRM in verse rundersera en in dezelfde sera nadat deze 7 dagen bij -25°C waren bewaard. Resultaten in mE/ml serum.

De in tabel 5 weergegeven resultaten laten zien dat er weinig of geen verschil is tussen de hoeveelheden grootmoleculair IRM die in vers of in 7 dagen oud serum gegenereerd kunnen worden. De waargenomen complexvorming is dus niet een gevolg van het feit dat oud serum werd gebruikt.

Tenslotte hebben we nog onderzocht of de vorming van grootmoleculair IRM niet slechts een fenomeen is dat alleen in vitro wordt waargenomen, doch ook in vivo kan optreden. Hiertoe

kregen ratten van ongeveer 200 gram lichaamsgewicht 20 E insuline via de staartvene toegediend. Dertig minuten na de injectie werd bloed uit de arteria carotis opgevangen in een 5%-ige citraatoplossing in een verhouding van 4 ml bloed op 1 ml citraatoplossing. Nadat het plasma verzameld was, werd het zo spoedig mogelijk over Sephadex G-100 gefiltreerd en de immunoreactiviteit in de globulinepool bepaald. Op deze wijze werd éénmaal het effect van toegediend ratte-insuline en tweemaal dat van toegediend runderinsuline nagegaan (tabel 6, eerste drie regels).

soort insuline toegediend	plasma	globuline fractie
rat	19,4	0,16
rund	37,5	0,28
rund	34,0	0,35
runderinsuline toegevoegd in vitro	40,4	0,01

Tabel 6. Vorming in vivo van grootmoleculair IRM bij ratten. Resultaten in mE/ml plasma.

In vergelijking met de resultaten die verkregen waren met de in vitro generatieproeven, werd nu relatief weinig grootmoleculair IRM gevonden. Na toediening van ratte-insuline werden slechts 160 μ E grootmoleculair IRM per ml plasma bepaald, na toediening van runderinsuline bedroeg dit 280 μ E en 350 μ E per ml plasma. Deze grootmoleculaire activiteit is inderdaad in vivo gevormd. Dit werd aangetoond door het bloed van onbehandelde ratten op te vangen in een citraatoplossing die ongeveer evenveel insuline bevatte als in het plasma van de behandelde dieren was gevonden. Onder deze omstandigheden konden in de globulinefractie slechts 10 μ E grootmoleculair IRM per ml plasma worden aangetoond.

SAMENVATTENDE BESCHOUWING

Bij de aanvang van de generatieexperimenten zijn we uitgegaan van de veronderstelling dat enzymatische verandering

van het toegevoegde insuline noodzakelijk zou zijn voor de vorming van een grootmoleculair insulinecomplex. Als we de resultaten van de experimenten nagaan, zijn er eigenlijk geen argumenten vóór een noodzakelijke enzymatische modificatie van het insulinemolecuul aan te voeren. Hoewel de invloed van enzymen op de complexvorming hiermee niet geheel is uit te sluiten, wordt deze toch wel zeer onwaarschijnlijk. Wel kunnen we een aantal argumenten tegen deze veronderstelling aanvoeren:

1. De aanwezigheid van insulinedegraderend leverhomogenaat is geen noodzakelijke voorwaarde voor de vorming van grootmoleculair IRM.
2. Bij toevoeging van insuline aan serum van 0°C treedt onmiddellijk complexvorming op.
3. Voorafgaande verwarming van serum op 60°C heeft geen vermindering van de complexvorming tot gevolg, doch doet deze juist toenemen.

De aanzienlijke toename van de complexvorming zou verklaard kunnen worden door het bestaan aan te nemen van een thermolabiele factor die de complexvorming in serum remt. Door verwarming zou deze hypothetische factor uitgeschakeld worden, waardoor de complexvorming kan toenemen. Deze mogelijkheid is echter niet waarschijnlijk, daar bij verwarming van geïsoleerde serumeiwitfracties zowel in de globuline- als de albuminefractie een toename van de complexvorming werd waargenomen (experimenten niet vermeld). In dat geval zou de thermolabiele factor in beide fracties met verschillende molecuulgrootte moeten voorkomen of er zouden twee verschillende thermolabiele factoren in serum moeten voorkomen.

Uit de verwarmingsexperimenten komt nog een andere mogelijkheid naar voren, nl. dat voor de complexvorming een veranderd (gedenatureerd) eiwit nodig is. Een aanwijzing dat er inderdaad enige denaturatie van serumeiwitten optreedt, vinden we in het feit dat het serum na verwarming enigszins opalescent is. We hebben echter niet na kunnen gaan of de eiwitcomponent van het complex op een of andere wijze gemodificeerd is.

Hoewel we niet nauwkeurig weten aan welke voorwaarden voldaan moet zijn om complexvorming van insuline met een of andere serumcomponent mogelijk te maken, zijn weder toch in geslaagd om door incubatie van insuline met serum een grootmoleculair insulinecomplex te doen ontstaan. Voor zover we hebben kunnen nagaan, had het gegenereerde insulinecomplex overeenkomstige eigenschappen als het immunoreactieve materiaal van de globulinefractie van serum 51119.

1. Zij waren beide radioimmunologisch aantoonbaar.

2. Zij waren biologisch werkzaam en het biologisch effect kon met anti-insulineserum onderdrukt worden.
 3. Zij werden beide in de globulinefractie aangetroffen.
- Dit maakt het wellicht mogelijk om dit complex te gebruiken als model voor een eventueel grootmoleculair endogeen insulinecomplex.

DISSOCIATIE VAN HET INSULINECOMPLEX

Om van een insulinecomplex of gebonden insuline te kunnen spreken, is het niet voldoende om door incubatie van serum en insuline grootmoleculaire activiteit te genereren die met biologische en immunologische methoden aangetoond kan worden. Tevens zal voldaan moeten worden aan de voorwaarde dat uit het grootmoleculaire materiaal weer kleinmoleculair insuline kan worden vrijgemaakt, zoals ook reeds door Merimee en medewerkers (1965) is gesteld. We hebben daarom onderzocht óf en onder welke omstandigheden het complex kan dissociëren.

Spontane dissociatie

Grootmoleculaire activiteit werd gegenereerd door 5 ml runderserum tezamen met runderinsuline (eindconcentratie 1 E/ml) gedurende 30 minuten bij 37°C te incuberen. Het geïncubeerde mengsel werd over Sephadex G-100 gescheiden, waarna de fracties van de globulinepiek werden gecombineerd, drooggevroren, gedialyseerd tegen gedemineraliseerd water en weer drooggevroren. Van het droge eiwit werd 70 mg opgelost in 5 ml veronalbuffer pH 8,5. Aan deze oplossing werd een geringe hoeveelheid [¹³¹I]insuline toegevoegd, waarna zij over Sephadex G-100 werd gefiltreerd met veronalbuffer die 0,025% albumine bevatte als elutiemiddel. De opgevangen fracties werden op grond van de radioactiviteitsverdeling verdeeld in drie "pools" en hiervan de immunologische reactiviteit bepaald.

In alle drie "pools" werd immunologisch bepaalbare activiteit aangetoond (fig. 12). Van de 12,3 mE die in totaal in het eluaat bepaald werden, werden 2,2 mE in het globulinegebied gevonden. De overige activiteit had bij de herchromatografie een kleinere mol. massa dan het materiaal dat bij de eerste scheiding was verzameld. Er is dus gedeeltelijke dissociatie van het oorspronkelijke grootmoleculaire insulinecomplex opgetreden.

Om na te gaan of de in fig. 12 weergegeven dissociatie een gevolg is van de bewerkingen die de globulinefractie heeft ondergaan alvorens opnieuw gefiltreerd te worden, dan wel spon-

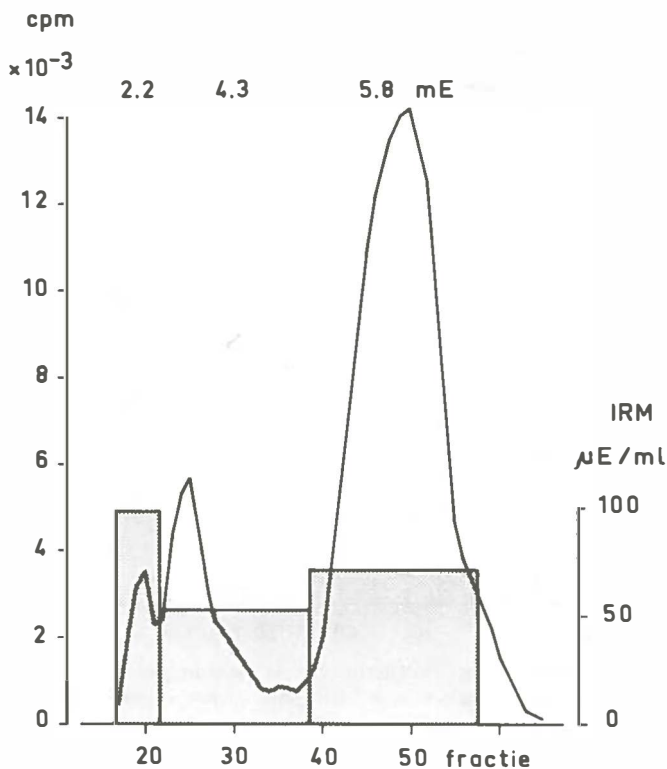


Fig. 12. Verdeling van de immunoreactiviteit over drie "pools" verkregen bij herfiltratie van grootmoleculair IRM bevattend globuline-eiwit over Sephadex G-100. De blokken geven het insulinegehalte in de samengevoegde fracties weer. — radioactiviteit.

taan kan optreden, werd het volgende experiment gedaan. Grootmoleculaire activiteit werd gegenereerd door serum gedurende 30 minuten bij 37°C met insuline te incuberen. Het materiaal werd over Sephadex G-100 gescheiden, waarbij het eluaat continu bij 280 nm werd gemeten en onmiddellijk voor herfiltratie in een tweede Sephadex G-100 kolom gevoerd. Zodra de globulinepiek uit de eerste kolom was geëluëerd, werd de toevoer van het eluaat naar de tweede kolom gestopt en werd deze tweede kolom met veronalbuffer geëluëerd. Het komt er dus in feite op neer dat de globulinefractie een Sephadexkolom van dubbele lengte moest doorlopen. Het scheidingspatroon van de tweede kolom is weergegeven in fig. 13.

Voor de bepaling van de activiteit werden telkens 4 fracties gecombineerd. Van de 20,0 mE die in totaal van de tweede ko-

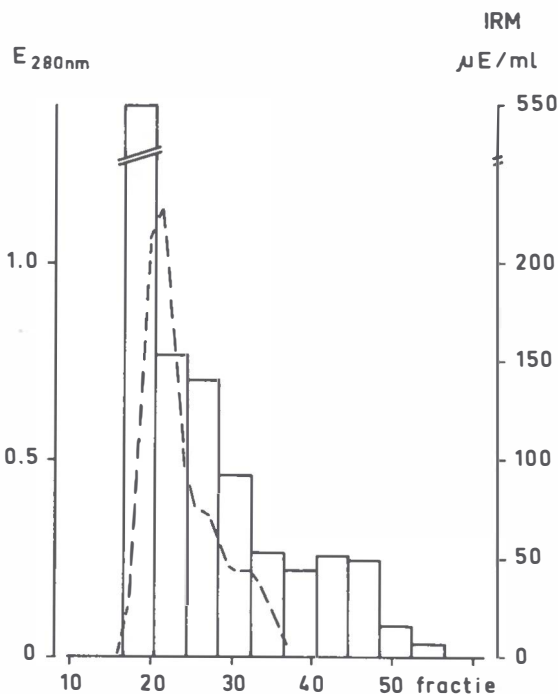


Fig. 13. Elutiepatroon verkregen bij herfiltratie van de globulinepiek over Sephadex G-100. Het eluaat van deze piek was voor herfiltratie op een tweede kolom gebracht onmiddellijk nadat het de eerste kolom had verlaten. De staven geven het insulinegehalte in de samengevoegde fracties weer. --- extinctie.

lom werden geëluëerd, werd 47,6% (9,53 mE) in de eerste "pool" van 4 fracties aangetoond. De langzaam in hoeveelheid afnemende immunoreactiviteit die hierna werd geëluëerd, zou een gevolg kunnen zijn van de aanwezigheid van activiteit met verschillende molecuulgrootte in het oorspronkelijke materiaal, die nu door de grotere kolomlengte beter werd gescheiden en door de bepaling in kleine "pools" beter als zodanig kon worden aangetoond. Het is echter ook mogelijk dat deze activiteit veroorzaakt werd door insuline dat aanvankelijk in een grootmoleculair complex gebonden was, doch tijdens de kolompassage continu dissocieerde, waardoor zij over een groot aantal fracties werd verdeeld. Met zekerheid kan evenwel gesteld worden dat de activiteit die in de fracties 40-56 werd aangetroffen, geëluëerd was in het gebied waar we vrij insuline mogen verwachten. Deze activiteit moet afkomstig zijn van een insulinecomplex dat aan het eind van de eerste kolom en/of aan het begin van de tweede kolom is gedissocieerd. Dissociatie van het complex kan dus in korte tijd (minder dan 3 uur) in waarneembare mate optreden. Het complex gedraagt zich bij herfiltratie zoals men bij een evenwicht $\text{insuline} + \text{eiwit} \rightleftharpoons \text{insuline-eiwitcomplex}$ zou mogen verwachten. Bij de dissociatie van het grootmoleculaire

complex is dus weer insuline vrijgekomen. Kleine veranderingen in het gedissocieerde insulinemolecuul zijn echter niet uitgesloten.

Invloed van zure pH

Hoewel uit de resultaten van de vorige paragraaf blijkt dat gedeeltelijke dissociatie van het grootmoleculaire insulinecomplex spontaan kan optreden, werd na simpele herfiltratie van het materiaal nimmer een volledige dissociatie waargenomen.

Om insuline uit een insuline-antilichaamcomplex vrij te maken wordt een dergelijk complex in het algemeen met zoutzuur op pH 2-3 gebracht, waarna het vrije hormoon met behulp van gelfiltratie verkregen kan worden. Wij hebben nagegaan of het op deze manier mogelijk was insuline volledig uit het door ons gegenereerde grootmoleculaire complex vrij te maken.

Grootmoleculair immunoreactief materiaal werd in droge vorm verkregen door runderserum na toevoeging van 1E runderinsuline per ml gedurende 30 minuten bij 37°C te incuberen, het incubatiemengsel over Sephadex G-100 te filtreren en de globulinepiek droog te vriezen, te dialyseren tegen water en vervolgens weer droog te vriezen. Van het droge eiwitmateriaal werd 70 mg opgelost in 3 ml veronalbuffer 0,025% albumine. Nadat een geringe hoeveelheid [¹³¹I]insuline als merker was toegevoegd, werd de oplossing kwantitatief op een Sephadex G-100 kolom gebracht en gefiltreerd met veronalbuffer 0,025% albumine pH 8,5 als elutiemiddel. Nog eens 70 mg van het droge eiwitmateriaal werd opgelost in 3 ml 0,005 N zoutzuur 0,025% albumine (pH \pm 2,5). Bij de filtratie werd 0,005 N zoutzuur 0,025% albumine als elutiemiddel gebruikt. De beide scheidingen werden parallel uitgevoerd. De beide eluaten werden op grond van het radioactiviteitspatroon in drie "pools" verdeeld. Van iedere "pool" werd het IRM-gehalte bepaald.

De resultaten die verkregen zijn met veronalbuffer als elutiemiddel zijn weergegeven in het linker deel van fig. 14. In totaal werden in het eluaat 12,2 mE IRM bepaald, waarvan 6,0 mE in het insulinegebied en 4,0 mE in het grootmoleculaire gebied. Bij de zure elutie (fig. 14, rechter deel) werden in de eerste "pool" 3,5 mE IRM aangetoond en 10,1 mE in het insulinegebied. De absolute hoeveelheden IRM die in de grootmoleculaire fracties van beide kolommen werden aangetoond, verschilden slechts weinig. Berekend op de totaal geelueerde activiteit was bij pH 8,5 nog 33% in grootmoleculaire vorm aantoonbaar tegen 22% bij pH 2,5. Opvallend is echter dat de totaal in het eluaat bepaalde activiteit bij zure elutie groter is

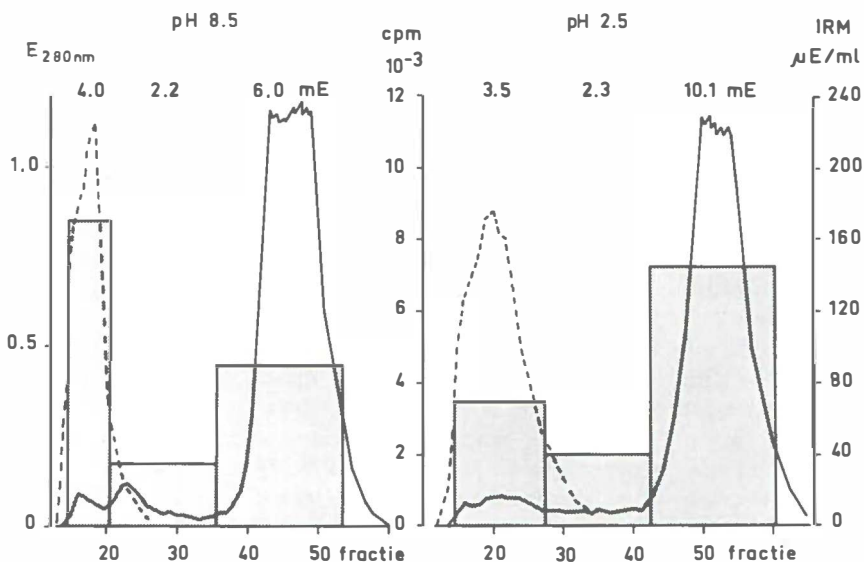


Fig. 14. Verdeling van de immunoreactiviteit over drie "pools" verkregen bij herfiltratie over Sephadex G-100 van grootmoleculair IRM bevattend globuline-eiwit bij pH 8,5 en pH 2,5. De blokken geven het insulinegehalte in de samengevoegde fracties weer. --- extinctie; — radioactiviteit.

dan met veronalbuffer, terwijl in beide gevallen van gelijke hoeveelheden activiteit werd uitgegaan. Een dergelijk verschijnsel werd ook waargenomen in 2 andere, niet identiek uitgevoerde, experimenten waarbij herfiltraties bij pH 8,5 en pH 2,5 met elkaar werden vergeleken. Een verklaring voor dit verschil kan niet worden gegeven. Het is niet bekend of de recovery bij pH 2,5 hoger was dan bij pH 8,5 of dat bij zure elutie meer activiteit in het eluaat werd bepaald dan in het uitgangsmateriaal aantoonbaar was.

Uit deze experimenten blijkt dat door behandeling met zuur bij pH 2,5 geen volledige dissociatie van het grootmoleculaire insulinecomplex kan worden verkregen.

Involed van ureum

Ureum is een stof die vaak gebruikt wordt om eiwitten of polypeptiden die niet covalent in een complex gebonden zijn te dissociëren. Wij hebben onderzocht of behandeling van het grootmoleculaire insulinecomplex met ureum zou resulteren in een toename van de dissociatie.

Voor de gelfiltratie werd nu gebruik gemaakt van Sephadex G-200. Bij filtratie van serum over deze Sephadex worden de serumeiwitten niet in twee, doch in drie fracties gescheiden doordat de globulinepiek in tweeën wordt verdeeld, waarbij de eerste piek de macroglobulinen bevat (Fireman e.m. 1964). Alleen de activiteit in de eerste eiwitpiek zal worden aangeduid als grootmoleculair complex. Of de activiteit in de andere eiwitfracties veroorzaakt werd door een insulinecomplex dan wel vrij, gedissocieerd insuline (zie paragraaf: spontane dissociatie) is niet nagegaan.

Runderserum werd op de gebruikelijke wijze met insuline gecubeerd en vervolgens over Sephadex G-200 gefiltreerd. Enkele fracties van de macroglobulinepiek werden gecombineerd, vervolgens werd een geringe hoeveelheid [^{131}I]insuline als merker toegevoegd. Aan 5 ml van deze grootmoleculaire "pool" werd ureum toegevoegd tot een concentratie van 6 M. De oplossing werd gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur bewaard, waarna zij kwantitatief voor herfiltratie op een Sephadex G-200 kolom werd gebracht. Parallel hieraan werd 5 ml van de "pool" gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur bewaard, zonder dat ureum was toegevoegd en vervolgens eveneens over Sephadex G-200 gefiltreerd. In beide gevallen werd veronalbuffer 0,025% albumine als elutiemiddel gebruikt. De eluaten werden ieder in 4 "pools" verdeeld (I macroglobulinegebied, II globulinegebied, III albumine- + postalbuminegebied, IV insulinegebied), waarna in iedere "pool" de hoeveelheid IRM werd bepaald.

De resultaten die in tabel 7 zijn weergegeven, suggereren dat

	I	II	III	IV	totaal
zonder ureum	0,72	0,46	0,20	1,48	2,86
6 M ureum	0,42	0,18	0,17	2,03	2,80

Tabel 7. Verdeling van de immunoreactiviteit bij herfiltratie over Sephadex G-200 van grootmoleculair IRM na 30 minuten bewaren bij pH 8,5 in aan- of afwezigheid van 6 M ureum. Resultaten in mE/pool.

door de behandeling met ureum enige verschuiving in de verdeling van de immunoreactiviteit is opgetreden. Van het met ureum behandelde materiaal werd 0,42 mE of 15% van de totaal geëluëerde activiteit (2,80 mE) in grootmoleculaire vorm bepaald, in het insulinegebied werd 2,03 mE aangetoond. Van het controlemateriaal was 0,72 mE of 25% van de totaal in het

eluaat bepaalde activiteit (2,86 mE) nog in grootmoleculaire vorm aanwezig, het insulinegebied bevatte nu 1,48 mE.

Voor herfiltratie was 2,17 mE IRM op de kolommen gebracht. In de eluaten werd dus meer activiteit bepaald dan er op de kolom gebracht zou zijn. Dit verschijnsel heeft zich bij alle experimenten waarbij macromoleculair insulinecomplex opnieuw over Sephadex G-200 werd gefiltreerd, voorgedaan (zie ook de volgende paragraaf).

In vergelijking met de controlekolom werd de dissociatie van het insulinecomplex wel enigszins door ureum gestimuleerd, doch de dissociatie was niet volledig.

Invloed van natriumdodecylsulfaat

Bij de pogingen om het grootmoleculaire insulinecomplex te dissocieren werd ook het effect van het detergens natriumdodecylsulfaat (SDS) nagegaan.

Runderserum werd in aanwezigheid van 1 E insuline per ml gedurende 30 minuten bij 37°C geïncubeerd. Na gelfiltratie van het incubatiemengsel over Sephadex G-200 werden drie piekfracties van het macroglobulinegebied gecombineerd. Deze "pool" werd in twee porties van ieder 5,5 ml verdeeld. Aan één portie werd droog SDS tot een concentratie van 0,4% toegevoegd. De beide porties werden gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur bewaard. Vervolgens werd een geringe hoeveelheid [¹³¹I]insuline als merker toegevoegd, waarna 5 ml op twee parallele Sephadex G-200 kolommen werd gebracht die met veronalbuffer 0,025% runderalbumine pH 8,5 werden geëluëerd. De fracties van iedere kolom werden in 4 "pools" verzameld (I macroglobuline, II globuline, III albumine en postalbumine, IV insuline) en hierin de immunoreactiviteit bepaald (fig. 15).

Bij de drie weergegeven experimenten werd gemiddeld 2,10 mE grootmoleculaire activiteit voor herfiltratie op de kolom gebracht. Na herfiltratie kon in het met SDS behandelde materiaal nog $0,90 \pm 0,021$ mE (\pm st. fout) in de macromoleculaire fractie worden aangetoond. Voor het controlemateriaal bedroeg deze hoeveelheid $1,15 \pm 0,166$ mE. Hoewel het verschil niet groot is, is het significant ($p < 0,02$). Evenals bij de herfiltraties over Sephadex G-200 die in de vorige paragraaf zijn vermeld, werd ook nu in het eluaat meer activiteit gevonden dan rechtstreeks in het op de kolom gebrachte materiaal aantoonbaar was. Opvallend is hierbij dat in het met SDS behandelde materiaal de toename in activiteit veel groter was dan in het controlemateriaal. Na behandeling van de macromoleculaire fractie met SDS werd in het eluaat 160% méér activiteit aangetoond

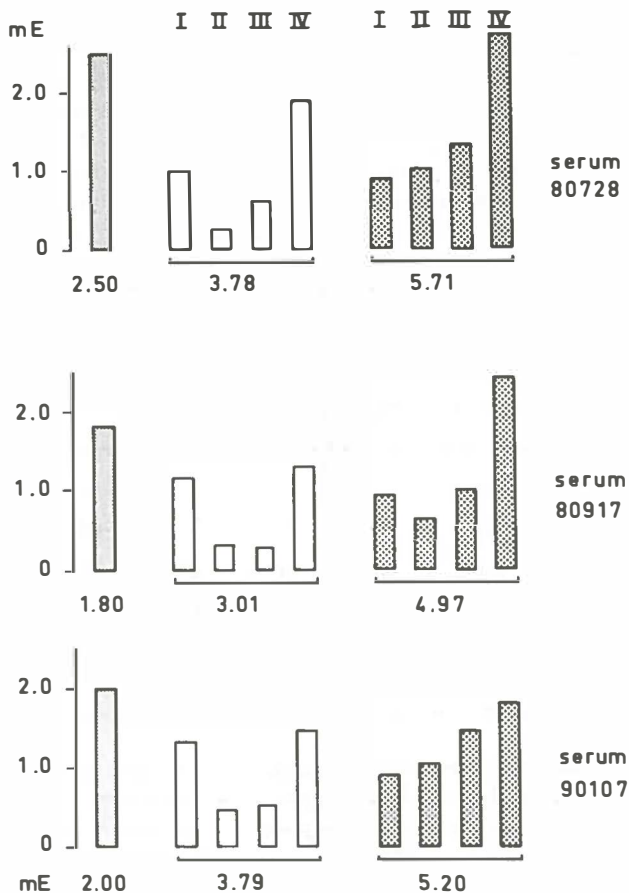


Fig. 15. Verdeling van de immunoreactiviteit over vier "pools" die verkregen waren bij de herfiltratie over Sephadex G-200 van IRM bevattend macroglobuline nadat dit materiaal al dan niet behandeld was met 0,4% SDS. De grijze staaf geeft aan hoeveel IRM op de kolom is gebracht, de witte staven geven het resultaat van het controlemateriaal weer, de gestippelde staven tonen het effect van een voorbehandeling met SDS. I macroglobulinefractie; II globulinefractie; III albumine- en post-albuminefractie; IV insulinegebied.

dan in het oorspronkelijke materiaal was bepaald. Bij de controlekolom bedroeg de toename van de activiteit 70%.

De extra toename van de activiteit die gevonden werd na de behandeling van het grootmoleculaire materiaal met SDS zou een gevolg kunnen zijn van een invloed van het detergens op het immunologisch bepalingssysteem. Dit werd onderzocht door se-

rum waaraan geen insuline was toegevoegd te scheiden over Sephadex G-200. Enkele fracties van de macroglobulinepiek werden gecombineerd, hieraan werd 0,4% SDS toegevoegd en na 30 minuten werd het mengsel voor herfiltratie op een Sephadex G-200 kolom gebracht. Het eluaat werd weer in vier "pools" verdeeld en voor iedere "pool" nagegaan hoe bekende, toegevoegde hoeveelheden runderinsuline werden terugbepaald. Uit de resultaten, die vermeld zijn in tabel 8, blijkt dat de af-

μE insuline toegevoegd \ pool	I	II	III	IV
-	-	1	-	-
20	21	21	18	16
40	36	42	35	41
80	91	88	75	74

Tabel 8. Terugbepaling van insuline dat werd toegevoegd aan fracties die verkregen waren bij herfiltratie van een met SDS behandelde macroglobulinepool.

wijkingen van 100% recovery binnen de meetfouten liggen. De veronderstelling dat de hoge opbrengst aan immunoreactief materiaal bij de SDS-proeven toegeschreven moet worden aan een remmende invloed van SDS op de insuline-antilichaam complexvorming, is dus niet gerechtvaardigd.

DISCUSSIE

Hoewel door vele onderzoekers ontkend wordt dat er binding van insuline aan serumeiwitten zou kunnen optreden (Berson & Yalow 1962, Kipnis & Stein 1964, Chao e.m. 1965, Yalow & Berson 1967), konden wij op eenvoudige wijze een grootmoleculair insulinecomplex genereren. Bij de experimenten waarbij de incubaties werden uitgevoerd in aanwezigheid van leverhomogenaat, leek toevoeging van een grote hoeveelheid insuline gewenst, aangezien een aanzienlijke afbraak van het hormoon verwacht werd, waarbij slechts een zeer gering deel van het beschadigde insuline nog immunologisch reactief zou zijn. Dit bleek overigens niet het geval te zijn. Gemiddeld kon ruim 65%

van de oorspronkelijk toegevoegde activiteit in het eluaat worden aangetoond, terwijl per ml serum enkele milli-eenheden grootmoleculair IRM werden gevormd. De hoge insulineconcentratie werd ook later gehandhaafd om de vorming van een insulinecomplex in aanwezigheid en afwezigheid van leverhomogenaat met elkaar te kunnen vergelijken en tevens om over een voldoende hoeveelheid grootmoleculaire activiteit te beschikken voor de dissociatieproeven.

De hoge insulineconcentratie van 1 E per ml incubatiemedium (ongeveer 1 insulinemolecuul per 90 eiwitmoleculen) kan als bezwaar gelden tegen de validiteit van de experimenten met betrekking tot de betekenis van insulinebinding aan bloedeiwitten onder fysiologische omstandigheden. De maximale insulineconcentratie bij normale personen bedraagt na stimulering 100 μ E per ml, de door ons gebruikte concentratie was een factor 10^4 hoger.

Procentueel gezien was de vorming van grootmoleculair IRM slechts zeer gering. In afwezigheid van leverhomogenaat werd gemiddeld slechts $0,38 \pm 0,017\%$ (\pm st. fout, $n = 16$) van de oorspronkelijk aan het incubatiemedium toegevoegde activiteit als grootmoleculair IRM bepaald. Wanneer werd uitgegaan van een insulineconcentratie van 10 mE per ml incubatiemedium, werd eenzelfde percentage, $0,37 \pm 0,050\%$ ($n = 5$), van de toegevoegde activiteit in grootmoleculaire vorm geëluëerd. Opvallend is echter het grote verschil in recovery die bij beide concentraties werd waargenomen. Bij de hoge concentratie werd $81,8 \pm 3,38\%$ van de oorspronkelijk toegevoegde activiteit in het eluaat bepaald, bij 10 mE per ml bedroeg dit slechts $57,1 \pm 2,49\%$. Het is niet bekend door welke oorzaak zoveel activiteit "verloren" is gegaan en of het verlies evenredig over alle fracties verdeeld was. Het is niet waarschijnlijk dat het verlies veroorzaakt is door adsorptie van insuline aan kolommateriaal. Na belasting met insuline werd routinematig 5 ml runder-serum door de kolommen gespoeld. Enkele malen werd het IRI-gehalte in de eiwitfracties van het spoelserum nagegaan. Zelfs na belasting van de kolom met 5 E insuline werd nimmer meer dan 100 μ E in het spoelserum aangetoond. Gezien het grote verschil in recovery kan men zich afvragen of de vorming van grootmoleculair IRM bij de twee insulineconcentraties betrokken moet worden op de oorspronkelijk toegevoegde activiteit dan wel op de in totaal geëluëerde activiteit. In het laatste geval zou bij de hoge insulineconcentratie de procentuele opbrengst aan grootmoleculaire activiteit gemiddeld $0,49 \pm 0,035\%$ hebben bedragen tegen $0,63 \pm 0,083\%$ bij de lage insulineconcentratie. Het verschil is echter niet significant ($0,10 > p > 0,05$).

Gezien de (procentueel) geringe complexvorming die bij onze

experimenten optrad, is het begrijpelijk dat anderen (Berson & Yalow 1962, Kipnis & Stein 1964, Chao e.m. 1965, Yalow & Berson 1967) bij hun experimenten, waarbij zij gebruik maakten van de ultracentrifuge, geen insulinebinding hebben waargenomen. In hun experimenten sedimenteerde 20-40% van het insuline met de serumeiwitten. Een dergelijk percentage werd ook gevonden, wanneer het insuline gecentrifugeerd werd in een eiwitvrij medium. Uit de overeenkomende percentages sedimentierend insuline concludeerden zij dat er geen binding van insuline aan serumeiwitten was opgetreden. Bij een spreiding tussen 20 en 40% in de sedimentatie van de activiteit is het echter niet mogelijk om een procentueel geringe insulinebinding waar te nemen.

Het gegenereerde grootmoleculaire complex kan spontaan voor een deel dissociëren waarbij weer insuline vrijkomt. Wij hebben ook waargenomen dat de dan nog resterende grootmoleculaire activiteit weer gedeeltelijk kan dissociëren, zoals men bij een evenwichtsreactie zou verwachten. Hoewel gedeeltelijke dissociatie van het insulinecomplex gemakkelijk optreedt, is het ons niet gelukt met enkele hiervoor gangbare methoden volledige dissociatie tot stand te brengen. Het is niet bekend waarom de binding, die gezien de spontane dissociatie niet covalent zal zijn, niet of nauwelijks op de door ons gebruikte middelen reageert. Alleen met ureum werd, in vergelijking met de controlekolom, enige afname van de complex-gebonden activiteit waargenomen.

Zowel na behandeling met SDS als bij pH 2,5 werd na herfiltratie in het eluaat een hogere opbrengst aan immunoreactief materiaal waargenomen dan in het eluaat van de controlekolommen. Deze toename van de totale immunoreactiviteit werd niet veroorzaakt door beïnvloeding van de immunologische bepaling door de gebruikte chemicaliën. Het verschil in activiteit met de controlekolommen zou dan ontstaan kunnen zijn door een hogere recovery (alleen bij pH 2,5) of door activering van de dissociatie (SDS, eventueel ook pH 2,5). Een activering werd ook gevonden bij herfiltratie van onbehandeld macromoleculair insulinecomplex over Sephadex G-200. De toename in activiteit zou veroorzaakt kunnen zijn, doordat in het complex meer insuline was gebonden dan rechtstreeks met de radioimmunologische methode bepaald kon worden. Door de herfiltratie over Sephadex G-200 zou dan de dissociatie van het complex gestimuleerd worden, waardoor meer insuline in vrije vorm beschikbaar kwam. Dit zou betekenen dat een deel van het complex of misschien al het complex-gebonden insuline niet rechtstreeks met de radioimmunologische methode bepaald kan worden, al-

leen het reeds gedissocieerde insuline zou worden aangetoond. Door herfiltratie over Sephadex G-200 zou het complex verder dissociëren waardoor een toename van de activiteit werd gevonden. SDS zou de dissociatie bevorderen, waardoor nog meer activiteit werd bepaald. Het feit dat de toename in activiteit alleen werd waargenomen, wanneer beide filtraties over Sephadex G-200 werden gedaan en niet wanneer een of beide kolommen Sephadex G-100 bevatten, zou misschien verklaard kunnen worden door het feit dat met Sephadex G-200 een betere scheiding in de serumeiwitten verkregen kan worden, waardoor mogelijk een factor die de dissociatie remt beter van het complex werd gescheiden.

Hoewel de toename in activiteit na herfiltratie over Sephadex G-200 en de versterking van dit effect door SDS verklaard kunnen worden door aan te nemen dat er in het complex meer insuline gebonden was dan er rechtstreeks in kon worden aangetoond, dient men te bedenken dat dit slechts een hypothese is die weliswaar op enkele waarnemingen is gebaseerd, doch waarvoor nog onvoldoende bewijs is geleverd. Hiervoor zal het nodig zijn ook met andere methoden dan gelfiltratie aan te tonen dat er uit het complex meer activiteit verkregen kan worden dan er rechtstreeks in bepaald is.

HOOFDSTUK VII

ONDERZOEKINGEN MET MENSELIJK BLOED

Uit de in de vorige hoofdstukken beschreven onderzoeken is gebleken dat althans bij het rund een afwijkende situatie kan bestaan, waarbij in de globulinefractie van het serum immunologisch en biologisch actief insuline-achtig materiaal kan voorkomen in hoeveelheden die het rechtstreeks in serum meetbare IRI aanzienlijk overtreffen. Tevens bleek het mogelijk door normaal runderserum met insuline bij 37°C te incuberen een grootmoleculair en dissocieerbaar insulinecomplex te doen ontstaan dat bij gelfiltratie over Sephadex G-100 in de globulinefractie wordt geëluëerd. In hoeverre deze beide verschijnselen op eenzelfde mechanisme berusten kon niet worden vastgesteld.

Deze vondsten waren aanleiding ook met menselijk bloed onderzoek te verrichten naar de eventuele spontane aanwezigheid van een grootmoleculair complex, respectievelijk naar de mogelijkheid door incubatie van serumeiwitten met insuline een complex te doen ontstaan. Besloten werd dit onderzoek te verrichten bij drie verschillende categorieën: 1) normale personen, 2) niet-diabetische patienten met ernstige adipositas, 3) patienten met overgewichtsdiaabetes ("maturity-onset" diabetes).

De keuze van deze categorieën van patienten geschiedde op grond van de volgende overwegingen. Adipositas is gebleken in vele gevallen gepaard te gaan met abnormaal hoge plasmainsuline-waarden (hyperinsulinisme). Dit verschijnsel treedt vooral aan het licht bij glucosebelasting (Karam e.m. 1963, Yalow e.m. 1965, Perley & Kipnis 1966). Ook indien tevens diabetes aanwezig is, blijkt het plasmainsuline bij glucosebelasting hogere waarden te bereiken dan bij gezonde proefpersonen van normaal lichaamsgewicht. Vergeleken met niet-diabetische adipuze patienten is de stijging van het plasmainsuline hier echter geringer en deze treedt bovendien vertraagd op.

Algemeen wordt aangenomen dat bij overgewichtsdiaabetes een relatief onvermogen bestaat om door middel van extra insuline-afgifte een met adipositas samenhangend insuline-antagonisme te doorbreken. Dit verklaart de paradoxale combinatie van hoge plasmainsuline-waarden en een gestoorde glucosetolerantie. Ook wordt hierdoor begrijpelijk dat vermagering van adipuze diabeten via dieetmaatregelen in vele gevallen tot verbetering van de gestoorde glucosetolerantie leidt. Adipositas wordt daar-

mee gezien als een van de factoren die een latent onvermogen tot compensatoire verhoging van de insulinesecretie manifest kunnen doen worden.

Er zijn vele aanwijzingen dat het insuline-antagonisme bij adipositas op een verminderde gevoeligheid van de perifere weefsels voor insuline berust (Rabinowitz e.m. 1962, Franckson e.m. 1966, Salans e.m. 1968, Stauffacher & Renold 1969). De theoretische mogelijkheid dat complexvorming van insuline met een eiwitcomponent in het bloed tot verminderde en/of veranderde werkzaamheid van het circulerend insuline zou leiden, is vrijwel geheel verworpen op grond van ernstige en groten-deels gerechtvaardigde kritiek op het werk van Antoniades. Zoals in de Hoofdstukken II en III is uiteengezet, is de mogelijkheid van een interactie tussen insuline en serumeiwitten echter juist voornamelijk gebaseerd op het werk van andere onderzoekers dan Antoniades. (Moloney 1962, Steinke e.m. 1962, Lyngsøe 1963, Samaan e.m. 1963a, Gjedde 1968). Onze in de Hoofdstukken V en VI beschreven resultaten vormden een reden te meer verder onderzoek te verrichten naar de aanwezigheid c.q. vormingsmogelijkheid van een grootmoleculair insulinecomplex bij de genoemde categorieën van patienten en proefpersonen. Hierbij zij opgemerkt dat een eventueel aanwezig insulinecomplex waarschijnlijk niet als zodanig in onbehandeld plasma of serum aantoonbaar is en dus niet het bij adipeuze patienten waargenomen hyperinsulinisme veroorzaakt. Wel zou op grond van een evenwicht tussen vrij insuline en zijn complex het insulinecomplex bij hyperinsulinisme in verhoogde mate aanwezig kunnen zijn.

PATIENTEN EN NORMALE PROEFPERSONEN

Het patientenmateriaal werd verkregen door medewerking van Dr. J.F.F. Lekkerkerker (Kliniek voor Inwendige Geneeskunde, Academisch Ziekenhuis te Groningen).

De diabetespatienten waren onbehandeld en bezochten de diabetespolikliniek voor de eerste maal voor controle op een klinisch manifeste diabetes. De diagnose werd gesteld op de spontane aanwezigheid van een bloedsuikergehalte van 160 mg% (8,9 mmol/l) of, wanneer dit niet het geval was, een maximale bloedsuikerwaarde van meer dan 160 mg% (8,9 mmol/l) en een waarde hoger dan 120 mg% (6,7 mmol/l) 2 uur na een orale glucosebelasting (100 gram glucose). Op patient no. 26 na hadden de patienten van deze categorie minimaal 25% overgewicht. De leeftijd varieerde van 14-76 jaar, het merendeel was ouder dan 50 jaar. Deze groep bevatte in totaal 17 patienten. Van 2 patienten

werd alleen het plasma onderzocht, van 9 alleen het serum en van 6 zowel het plasma als het serum.

De meeste adipeuze niet-diabetische patiënten bezochten de kliniek i.v.m. hun aanzienlijk overgewicht, dit bedroeg minimaal 30%. Deze groep was gemiddeld jonger dan de vorige. De leeftijd varieerde tussen 14 en 46 jaar. Tot afwezigheid van diabetes werd bij deze categorie patiënten geconcludeerd op grond van het feit dat de bloedsuikerwaarden beneden de voor diabetes gestelde grenzen bleven. Bij de selectie van deze categorie patiënten werd niet gestreefd naar een blanco familie-anamnese m.b.t. het voorkomen van diabetes. Bij verschillende patiënten uit deze categorie bleken een of meerdere naaste familieleden aan deze aandoening te lijden. Deze groep bevatte 13 patiënten. Van 3 patiënten werd het plasma onderzocht en van 11 het serum.

Bij de groep van de normale proefpersonen kwamen, voor zover kon worden nagegaan, geen endocriene afwijkingen voor en was ook de familie-anamnese m.b.t. het voorkomen van diabetes negatief. De leeftijden van deze groep varieerden van 20-63 jaar. In totaal bevatte deze groep 9 personen. Van 3 personen werd alleen het plasma onderzocht, van 3 personen werd alleen het serum onderzocht, terwijl van de overige 3 personen zowel plasma als serum onderzocht werden.

METHODEN

Bij het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek werd gebruik gemaakt van zowel plasma als serum. Plasma werd verkregen door 8 ml bloed op te vangen in 2 ml van een 5%-ige natrium-citraatoplossing en zo spoedig mogelijk na het afnemen van het bloed het plasma te verzamelen. Hiervan werd 5 ml over een Sephadex G-100 kolom gescheiden met veronalbuffer pH 8,5 als elutievloeistof. De gelfiltratie van het plasma, die plaats vond bij 4°C, werd steeds gestart 30-40 minuten na de bloedafname.

Werd serum gebruikt als uitgangsmateriaal voor de bereiding van de eiwitfracties, dan werd het bloed eerst 2 uur bij kamertemperatuur bewaard om te stollen. Het serum werd hierna verzameld, in een aantal porties verdeeld en ingevroren bij -25°C. Als regel werd het serum 6-10 dagen na de bloedafname over Sephadex G-100 gescheiden.

De verdeling van de eiwitten in de eluaten werd gemeten bij 280 nm. Op grond van het hieruit verkregen beeld werden de fracties samengevoegd tot een globuline- en een albuminepool. Van iedere "pool" werd een geringe hoeveelheid weggezet voor radioimmunologische insulinebepaling. De "pools" werden vervol-

gens drooggevroren, het droge materiaal werd opgelost in ± 10 ml gedemineraliseerd water en gedurende 48 uur tegen gedemineraliseerd water gedialyseerd en vervolgens weer drooggevroren. In het droge eiwit werden radioimmunologische insulinebepalingen verricht door een gedeelte van het eiwit op te lossen in veronalbuffer tot een eindconcentratie van 2,5 mg/ml in het bepalingssysteem.

In verband met de mogelijkheid dat er aanvankelijk een insulinecomplex in het bloed aanwezig was dat tijdens de bewerking zou kunnen dissociëren, werd tevens nagegaan hoeveel grootmoleculaire activiteit in de eiwitfracties gegenereerd kon worden. De hoeveelheid gevormd complex zou wellicht een maat kunnen zijn voor het aantal beschikbare bindingsplaatsen in het materiaal. Voor de generatieproeven werden de eiwitten steeds opgelost in een concentratie van 15 mg/ml. Voordat de verdere bewerking plaats vond, werd de globulineoplossing gecentrifugeerd, daar hierin steeds een geringe hoeveelheid onoplosbaar materiaal aanwezig was. Aan 5 ml eiwitoplossing werd 0,4 ml [131 I] insulineoplossing (50-150 μ E) en 0,225 ml van een insulineoplossing die 1 mg runderinsuline per ml bevatte, toegevoegd (eindconcentratie insuline 40 μ g = 1 E per ml). Het mengsel werd gedurende 30 minuten bij 37°C geïncubeerd. Onmiddellijk hierna werd 5 ml van het mengsel over Sephadex G-100 gefiltreerd. Het samenvoegen van de fracties geschiedde nu op basis van de radioactiviteitsverdeling. Zowel bij generatieproeven met globuline als met albumine werd de activiteit die in het globuline-gebied van het eluaat werd aangetroffen aangeduid als grootmoleculair IRM. Uit de gemeten activiteit werd de gegenereerde activiteit per mg eiwit zowel als per ml plasma of serum berekend.

RESULTATEN

Droge eiwitfracties

De in de tabellen 9 en 10 weergegeven resultaten laten zien dat ook in menselijke eiwitfracties grootmoleculair IRM kan voorkomen. Bij drie van de acht diabeten waarbij van plasma werd uitgegaan (patienten 4, 23 en 26), werd in het droge globuline immunoreactiviteit aangetoond in hoeveelheden die, omgerekend per ml plasma, ongeveer 10-20 maal hoger waren dan in het onbehandelde plasma waren bepaald (tabel 9). Ook wanneer van serum werd uitgegaan voor de bereiding van droog eiwit werd in enkele gevallen in het globuline-eiwit grootmoleculair IRM aangetoond (tabel 10). Dit was echter niet alleen

Tabel 9. Gegevens en resultaten van personen van wie plasma werd onderzocht.

Nr	M/V	leef- tijd	gewicht kg	lengte cm	gehalte plasma	gehalte droge eiwitfracties		generatie grootmoleculair IRM in droog eiwit				totaal te genereren	mg eiwit/ml plasma		totaal eiwit
					µE/ml	µE/ml	plasma	mE/mg eiwit	mE/ml plasma	mE/ml	plasma	mE/ml	glob.	alb.	mg/ml
						glob.	alb.	glob.	alb.	glob.	alb.		glob.	alb.	
<i>Adipositas + Diabetes</i>															
4	V	54	97	164	9	84	—	0,93	0,149	24,97	3,87	28,84	26,72	26,08	52,80
10	V	58	85	162	9	3	7	0,36	0,087	6,19	1,96	8,15	17,20	22,49	39,69
19	V	76	112	165	11	2	11	0,36	0,114	8,09	2,62	10,71	22,48	23,02	45,50
20	V	46	89	145	10	6	9	0,30	0,078	7,84	1,69	9,53	26,54	21,62	48,16
21	V	14	81	165	5	14	18	0,65	0,090	13,90	2,31	16,21	21,50	25,68	47,18
23	V	75	88	154	26	587	8	0,53	0,093	13,12	2,19	15,31	24,86	23,50	48,36
25	M	40	98	176	10	2	3	0,44	0,141	9,01	3,67	12,68	20,44	26,00	46,44
26	V	69	70	164	12	112	8	0,30	0,111	8,37	2,51	10,88	28,32	22,64	50,96
Gemiddeld								0,48	0,107	11,44	2,60	14,04	23,51	23,88	47,39
St. fout								0,08	0,009	2,15	0,27	2,33	1,33	0,63	1,39

Adipositas

1	V				15	13	-	0,41	0,038	11,39	0,73	12,12	27,92	19,48	47,40
3	V	16	119	170	18	8	-	0,38	0,174	7,52	4,78	12,30	19,74	27,48	47,22
24	V	23	174	175	30	9	2	0,42	0,154	10,43	3,37	13,80	25,00	21,78	46,78
Gemiddeld								0,40	0,122	9,78	2,96	12,74	24,22	22,91	47,13
St. fout								0,01	0,042	1,16	1,19	0,53	2,39	2,38	0,18

Normale controles

2	M	41	71	175	5	-	-	0,32	0,057	6,30	1,42	7,72	19,54	24,96	44,50
5	M	24	66	173	1	16	2	0,32	0,054	7,36	1,07	8,43	22,82	19,74	42,56
6	V	41	66	176	4	10	9	0,14	0,044	3,95	0,74	4,69	28,34	17,06	45,40
7	M	32	67	186	4	4	4	0,32	0,039	6,01	0,89	6,90	18,80	22,82	41,62
8	V	20	59	167	7	3	4	0,41	0,032	8,63	0,72	9,35	21,14	22,98	44,12
9	M	32	75	183	6	8	-	0,21	0,066	3,90	1,64	5,54	18,84	24,82	43,66
Gemiddeld								0,29	0,049	6,03	1,08	7,11	21,58	22,06	43,64
St. fout								0,04	0,005	0,76	0,15	0,72	1,49	1,26	0,56

Tabel 10. Gegevens en resultaten van personen van wie serum werd onderzocht.

Nr	M/V	leeftijd	gewicht	lengte	gehalte	gehalte droge		generatie grootmoleculair				totaal te			totaal
					serum	eiwitfracties		IRM in droog eiwit				genereren			eiwit
					µE/ml	µE/ml	serum	mE/mg	eiwit	mE/ml	serum	mE/ml	mg eiwit/ml	serum	mg/ml
			kg	cm		glob.	alb.	glob.	alb.	glob.	alb.		glob.	alb.	
Adipositas + Diabetes															
13	M	20	155	192	92	15	26	0,24	0,031	9,20	0,70	9,90	38,56	22,08	60,64
19	V	76	112	165	13	429	140	0,43	0,113	19,12	4,28	23,40	44,72	38,04	82,76
20	V	46	89	145	22	-	7	0,53	0,084	17,41	2,54	19,95	32,78	30,24	63,02
21	V	14	81	165	5	-	9	0,58	0,102	15,71	4,00	19,71	27,20	39,22	66,42
22	V	66	88	169	18	-	-	0,51	0,107	19,70	3,79	23,49	38,52	35,56	74,08
23	V	75	88	154	35	9	4	0,46	0,076	17,99	2,50	20,49	38,94	32,70	71,64
25	M	40	98	176	12	9	29	0,53	0,081	17,28	3,41	20,69	32,64	42,04	74,68
26	V	70	70	164	14	4	4	0,53	0,059	16,72	2,02	18,74	31,58	34,56	66,14
27	V	66	85	164	25	15	-	0,39	0,041	16,08	1,45	17,53	41,72	35,88	77,60
28	V	67	79	163	18	74	2	0,50	0,050	12,09	1,88	13,97	24,06	37,88	61,94
32	V	64	78	167	11	-	-	0,44	0,038	15,67	1,32	16,99	34,12	35,20	69,32
33	V	53	109	172	11	2	3	0,31	0,039	9,66	1,21	10,87	31,12	31,08	62,20
37	V	52	115	169	36	-	-	0,54	0,099	19,68	3,31	22,99	36,54	33,40	69,94
39	V	69	85	167	19	-	5	0,63	0,084	23,02	2,95	25,97	36,36	35,16	71,52
42	V	32	96	175	4	206	-	0,45	0,116	13,59	3,42	17,01	30,09	29,61	59,70
Gemiddeld								0,47	0,075	16,19	2,59	18,78			
St. fout								0,03	0,008	0,98	0,29	1,18			

11	V	15	126	163	27	5	17	0,58	0,080	19,49	1,92	21,41	33,86	24,16	58,02
12	V	46	98	165	8	23	9	0,31	0,066	9,29	1,72	11,01	30,80	26,08	56,88
15	V	16	102	170	11	19	68	0,30	0,037	8,70	1,57	10,27	28,58	41,74	70,32
16	V	38	139	173	2	6	-	0,31	0,027	11,64	0,88	12,52	37,66	32,63	70,29
24	V	23	174	175	25	7	-	0,57	0,147	15,92	5,32	21,24	28,08	36,20	64,28
34	M	33	143	193	36	12	12	0,74	0,150	19,41	5,75	25,16	26,30	38,32	64,62
35	V	23	97	156	9	6	-	0,43	0,171	10,69	6,16	16,85	24,74	36,00	60,74
36	M	24	122	173	41	6	-	0,34	0,120	9,42	4,52	13,94	27,90	37,64	65,54
38	V	25	117	167	24	3	4	0,49	0,077	14,91	2,51	17,42	30,50	32,86	63,36
40	V	14	100	171	36	-	-	0,53	0,180	11,87	7,20	19,07	22,30	40,02	62,32
41	V	18	98	175	25	3	-	0,60	0,239	14,29	7,98	22,27	23,82	33,44	57,26
Gemiddeld								0,47	0,118	13,24	4,14	17,38			
St. fout								0,04	0,020	1,17	0,76	1,49			

Normale controles

2	M	41	71	175	7	5	19	0,35	0,042	9,31	1,43	10,74	26,40	33,94	60,34
5	M	24	66	173	7	816	6	0,33	0,071	9,34	2,82	12,16	28,18	39,96	68,14
6	V	41	66	176	5	18	11	0,31	0,057	11,43	1,72	13,15	36,62	30,12	66,74
14	M	34	92	195	7	13	12	0,33	0,061	7,52	2,13	9,65	22,56	34,70	57,26
18	V	40	54	167	7	5	2	0,38	0,069	11,67	2,52	14,19	30,50	36,50	67,00
31	V	63			3	-	-	0,35	0,048	11,42	1,41	12,83	32,14	29,58	61,72
Gemiddeld								0,34	0,058	10,12	2,01	12,12			
St. fout								0,01	0,005	0,68	0,24	0,68			

het geval in materiaal dat afkomstig was van diabeten (patiënten 19, 28 en 42). Ook in het globuline van een van de normale controlepersonen (no. 5) werd een aanzienlijke hoeveelheid IRM (816 $\mu\text{E}/\text{ml}$ serum) bepaald. In het serum van deze controlepersoon waren slechts 7 $\mu\text{E}/\text{ml}$ aangetoond. Bij de patiënten no. 15 en 19 werd ook in het droge eiwit van de albuminefractie grootmoleculair IRM aangetoond.

Evenals voor de droge eiwitfracties van runderserum 51119

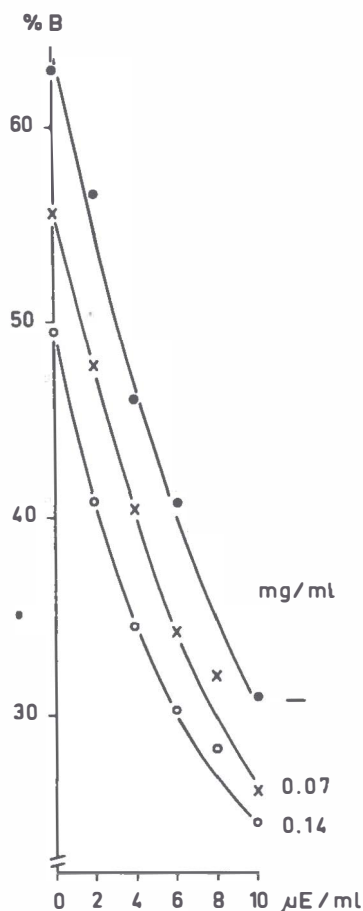


Fig. 16 Radioimmunologisch bepaalde standaardlijnen voor humaan insuline in aanwezigheid van verschillende concentraties van de droge serumglobulinefractie van controlepersoon no. 5.

was gedaan (Hoofdstuk V, fig. 7), werden ook voor het grootmoleculair IRM bevattend globuline-eiwit van controlepersoon no. 5 met de radioimmunologische methode standaardlijnen bepaald in aanwezigheid van verschillende eiwitconcentraties. Deze standaardlijnen liepen parallel met de standaardlijn die verkregen werd in afwezigheid van toegevoegd globuline-eiwit (fig. 16). Bovendien werd het IRM-gehalte van het globulinepreparaat in drie concentraties met twee verschillende anti-insulinesera bepaald. De antisera werden ruim $3\frac{1}{2}$ jaar na elkaar bereid. De resultaten laten zien dat met beide antisera geheel met elkaar overeenkomende waarden werden gevonden (tabel 11).

De biologische werking van het droge globuline-eiwit van de controlepersoon werd bepaald met behulp van geïsoleerd vetweefsel. Van het eiwit (afkomstig van 2 isoleringen) werd een hoeveelheid opgelost in Krebs-Ringer bicarbonaatbuffer die 2 mg glucose per ml bevatte. In de (2 + 1) puntsbepaling werd een totale ILA van 60 $\mu\text{E}/\text{ml}$ (grenzen 43-97 $\mu\text{E}/\text{ml}$) aangetoond waarvan 16 $\mu\text{E}/\text{ml}$ (grenzen 12-22 $\mu\text{E}/\text{ml}$) niet met anti-insulineserum geneutraliseerd konden worden. Radioimmunologisch werd in het incubatiemedium een IRI-gehalte bepaald van 50 $\mu\text{E}/\text{ml}$.

eiwit mg/ml	AS 8 μE/ml	AS 812 μE/ml
3,08	86	83
1,54	39	39
0,77	18	16

Tabel 11. Radioimmunologisch bepaalde activiteit van globuline-eiwit van controlepersoon no. 5.

Generatie van een grootmoleculair insulinecomplex

Bij de generatieproeven die gedaan zijn met uit plasma bereid globuline-eiwit, werd geen significant verschil waargenomen tussen de hoeveelheden grootmoleculair IRM die bij de verschillende groepen per mg droog eiwit gevormd konden worden (fig. 17, tabel 9). Wanneer uitgegaan werd van uit serum bereid globuline-eiwit, was de bij adipeuze diabeten gegenereerde hoeveelheid IRM groter dan bij de normale controles bij een p -waarde $< 0,01$ (fig. 18, tabel 10). Hoewel deze hoeveelheid bij enkele diabeten overeenkwam met die bij de normale controles was het verschil significant. Ook aan het globuline van de adipeuze controles kon meer insuline gebonden worden dan aan het overeenkomstige eiwit van de normale controles ($p < 0,05$).

In het droge eiwit van de uit plasma verkregen albuminefractie kon bij de adipeuze diabeten meer grootmoleculaire activiteit gegenereerd worden ($p < 0,01$), dan bij de normale controlepersonen (fig. 17, tabel 9). Per mg eiwit werd bij de diabeten ongeveer twee maal zoveel insuline gebonden als bij de controles. Wanneer serumalbumine gebruikt werd voor de generatieproeven, werd er geen verschil gevonden tussen de adipeuze diabeten en de controlegroep (fig. 18, tabel 10). In het serumalbumine van de niet-diabetische adipeuze patienten kon wel meer grootmoleculaire activiteit gevormd worden dan bij de normale controlepersonen ($p < 0,05$). Ook het verschil tussen de niet-diabetische adipeuze patienten en de adipeuze diabeten is significant ($p < 0,05$).

Uit de zowel in het globuline- als het albumine-eiwit gegenereerde hoeveelheden insulinecomplex kan berekend worden hoeveel grootmoleculair IRM er per ml plasma gevormd wordt (fig. 19, tabel 9). Deze hoeveelheid is voor de groep van de adipeuze diabeten groter dan voor de normale controlegroep ($p < 0,05$). Ook als we de totaal per ml te genereren grootmoleculaire ac-

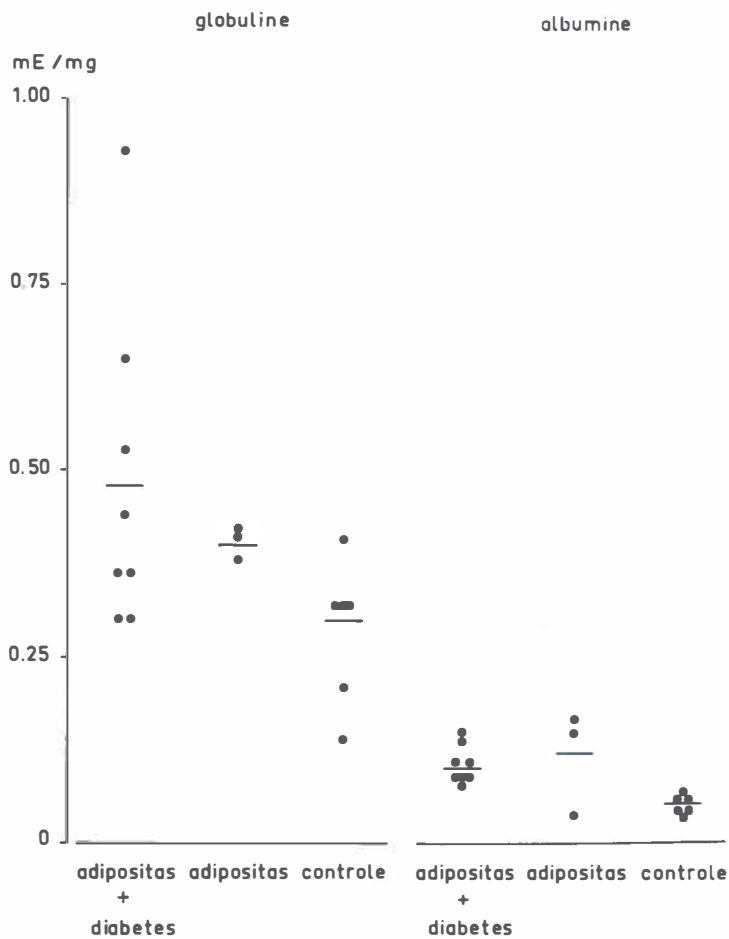


Fig. 17. Hoeveelheden grootmoleculair IRM die gegenereerd konden worden in droge eiwitfracties verkregen uit plasma van overgewichtsdiaabeten, patienten met adipositas en normale controlepersonen.

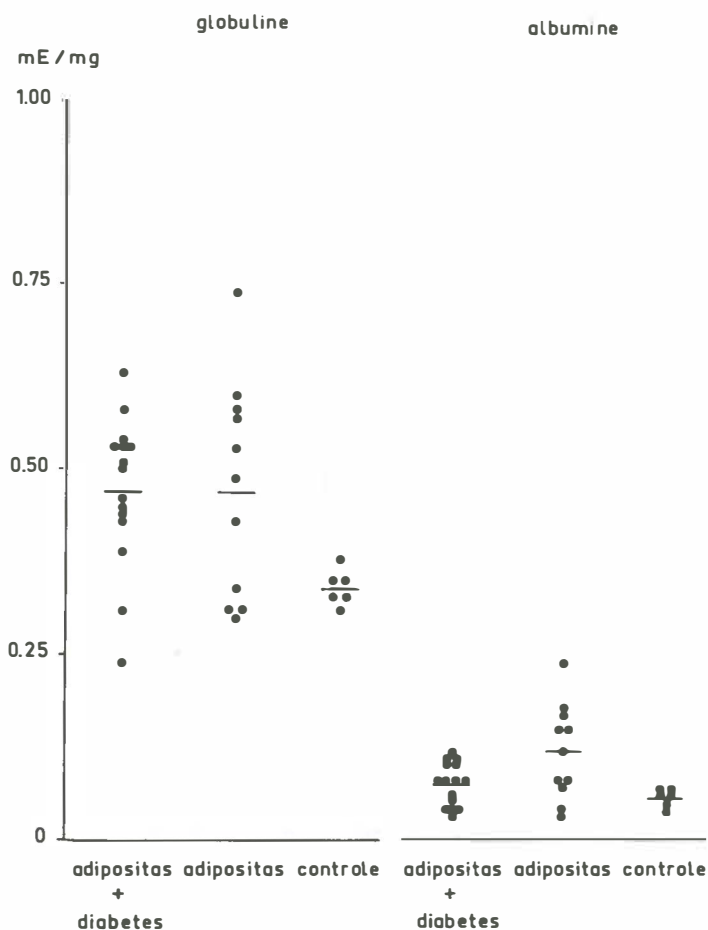


Fig. 18. Hoeveelheden grootmoleculair IRM die gegenereerd konden worden in droge eiwitfracties verkregen uit serum van overgewichtsdiaabeten, patienten met adipositas en normale controlepersonen.

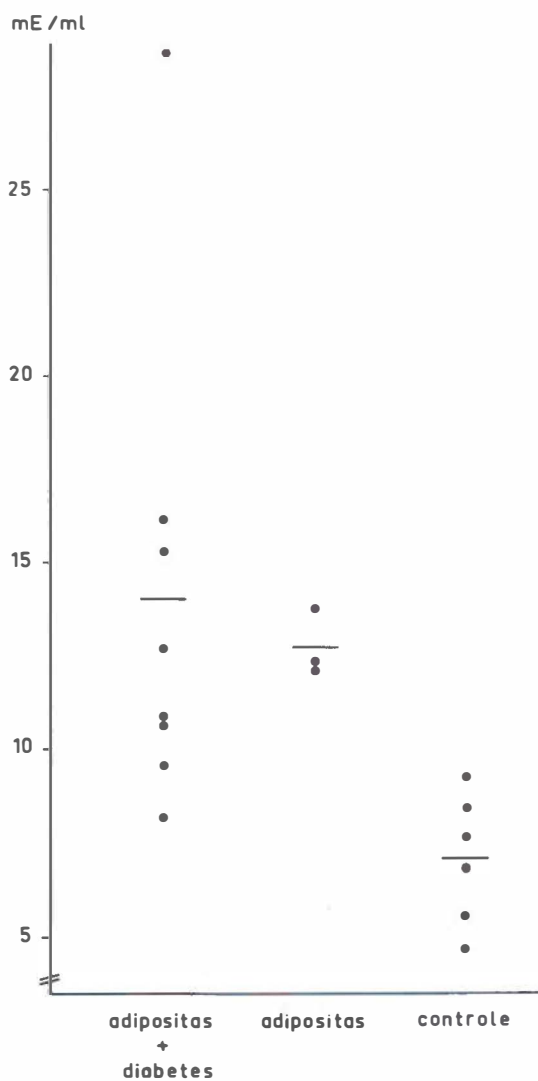


Fig. 19. Hoeveelheden grootmoleculair IRM die in droge eiwitfracties gegenereerd konden worden. Resultaten weergegeven per ml plasma.

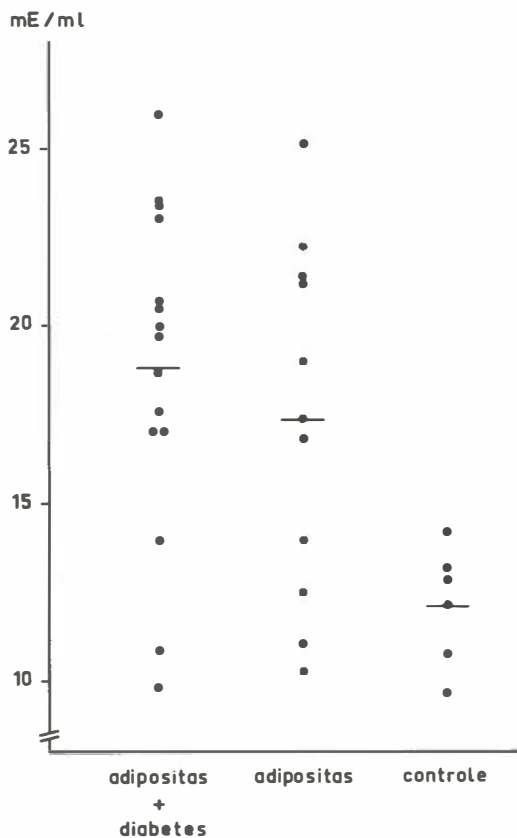


Fig. 20. Hoeveelheden grootmoleculair IRM die in droge eiwitfracties gegenereerd konden worden. Resultaten weergegeven per ml serum.

tiviteit voor het serum berekenen (fig. 20, tabel 10) kan er bij de adipeuze diabeten meer complex gevormd worden dan bij de normale controlepersonen ($p < 0,01$). Ook bij de niet-diabetische adipeuze patienten was het bindend vermogen voor insuline groter dan bij de controlegroep ($p < 0,05$).

DISCUSSIE

Zowel uit de met plasma als de met serum verkregen resultaten blijkt dat ook bij de mens immunoreactief materiaal in grootmoleculaire vorm in het bloed kan voorkomen. Bij 31 van de 49 onderzochte plasma- en serummonsters werd in de droge globulinefractie grootmoleculair IRM aangetoond in hoeveelheden die groter waren dan de minimaal detecteerbare hoeveelheid ($5 \mu\text{E/ml}$ of meer), in 7 gevallen werden zelfs aanzienlijke hoeveelheden ($74\text{--}816 \mu\text{E/ml}$) gevonden. Ook in de albuminefractie kon in 23 gevallen IRM worden aangetoond waarbij in 2 gevallen een grote hoeveelheid (68 en $140 \mu\text{E/ml}$).

Op grond van dezelfde overwegingen als in Hoofdstuk V naar voren zijn gebracht kan contaminatie met insuline als oorzaak van het gevonden IRM worden uitgesloten.

Daar in een aantal gevallen de hoeveelheid grootmoleculaire activiteit groter was dan in het oorspronkelijke serum of plasma werd aangetoond, moet zij hierin aanvankelijk in een "verborgen" vorm aanwezig geweest zijn. In geen enkel geval waren echter in het kolomeluaat significante hoeveelheden immunoreactief materiaal aangetoond, zodat het grootmoleculaire IRM pas bij de verdere bewerking uit zijn "verborgen" vorm in een bepaalbare vorm is overgegaan. Het is niet bekend bij welke stap van de bewerking deze overgang kan hebben plaatsgevonden, doch de bepaalbare vorm moet waarschijnlijk reeds als zodanig in het droge materiaal aanwezig geweest zijn, daar bij herbepaling in een opnieuw bereide oplossing van hetzelfde droge materiaal eenzelfde activiteit werd gevonden.

Zowel in de albumine- als globulinefractie werd IRM aangetoond, echter vaker en een grotere hoeveelheid in het globuline dan in het albumine. Globuline-eiwit van controlepersoon no. 5 in verschillende concentraties aan de standaardlijn toegevoegd had een soortgelijke verschuiving van deze lijn tot gevolg als men verwachten mag, wanneer extra insuline zou zijn toegevoegd. De mogelijkheid dat het IRM toe te schrijven zou zijn aan andere eiwitten dan insuline, die enkele antigene determinanten zouden kunnen bezitten die overeenkomen met die van het hormoon en daardoor als insuline zouden worden bepaald, is niet waarschijnlijk. Bij gebruik van verschillende anti-insu-

linesera werden gelijke IRM-waarden gevonden (Berson & Yalow 1968). Radioimmunologisch kon dus geen onderscheid gemaakt worden tussen het grootmoleculaire IRM van controlepersoon no. 5 en kristallijn humaan insuline. Ook was het materiaal biologisch actief en kon de activiteit voor het grootste deel met anti-insulineserum geneutraliseerd worden. Aan twee van de drie in Hoofdstuk III genoemde criteria werd dus voldaan. Wegens gebrek aan voldoende materiaal was het niet mogelijk de dosisafhankelijkheid van de biologische werking na te gaan.

Hoewel het geteste materiaal met de door ons gebruikte methoden niet van insuline onderscheiden kon worden, lijkt het ons toch enigszins voorbarig om de activiteit ervan aan een insuline-eiwitcomplex toe te schrijven. We hebben nog niet kunnen nagaan of uit het eiwitmateriaal vrij insuline verkregen kon worden. Ook weten we niet hoe het mogelijk is dat een aanvankelijk niet aantoonbare activiteit in een bepaalde vorm overgaat. Bovendien is de spontane aanwezigheid van natief grootmoleculair IRM niet een constant voorkomend fenomeen. Bij twee patiënten (23 en 26) werd uit het plasma wel grootmoleculair IRM verkregen, terwijl dit niet het geval was met serum dat bij dezelfde gelegenheid was afgenomen. Het omgekeerde is ook gevonden (patient 19). In een serumglobulinefractie van controlepersoon no.5 werd een zeer grote hoeveelheid IRM aangetoond. Dit was niet het geval met plasma- en serummonsters die op andere tijdstippen waren verkregen. Ook blijkt de hoeveelheid in het globuline-eiwit aantoonbare IRM af te nemen met het verouderen van het serum. In het globuline-eiwit van controlepersoon no.5 konden aanvankelijk 800 μ E IRM per ml serum worden aangetoond, 4 $\frac{1}{2}$ maand later werd uit hetzelfde serum ongeveer 250 μ E grootmoleculair IRM per ml verkregen, terwijl dit na 7 maanden nog slechts 20 μ E bedroeg. Dit suggereert dat onder bepaalde, tot nu toe onbekende omstandigheden, grootmoleculaire activiteit verloren kan gaan of in een nog moeilijker bepaalde vorm worden omgezet.

Een ander opmerkelijk resultaat werd verkregen bij de generatieproeven. Hoewel we, gezien de aard van de proeven, niet kunnen zeggen of het hier binding aan een specifiek dragereiwit betreft, is het toch wel duidelijk dat we hier te maken hebben met een verschil in de eiwitten van de adipeuze patienten en de personen met een normaal lichaamsgewicht. In het geval dat plasma gebruikt werd als uitgangsmateriaal voor de bereiding van de eiwitpreparaten, werd door het eiwit in de albuminefractie van de adipeuze patienten per mg eiwit significant meer insuline gebonden dan bij de normale controlepersonen. Ook de totale hoeveelheid grootmoleculaire activiteit die per ml

plasma gegenereerd kon worden, was bij de patienten met adipositas significant verhoogd t.o.v. de normale controles.

Wanneer serum gebruikt werd, werd in de globulinefractie van de beide groepen adipeuze patienten per mg eiwit een hogere bindingscapaciteit voor insuline gevonden dan bij de normale controles. Dit was niet zonder meer het geval, wanneer de hoeveelheid insulinecomplex in het globuline per ml serum werd berekend. Bij de adipeuze diabeten was het verschil met de normale controles significant ($p < 0,01$), terwijl het verschil tussen de adipeuze patienten die geen diabetes hadden en de controlepersonen niet significant was. Per mg eiwit van de albuminefractie werd bij de niet-diabetische adipeuze patienten meer insuline gebonden dan bij de normale controles, ook het verschil tussen de adipeuze patienten met en zonder diabetes was significant. Bij vergelijking van de hoeveelheden insuline die totaal aan de serumeiwitten per ml serum gebonden konden worden, blijkt dat in beide groepen adipeuze patienten significant meer insuline gebonden werd dan bij de normale controlepersonen.

Verschillende onderzoekers (Páv e.m. 1963, Berns e.m. 1965, Penchev e.m. 1968, Ditzov e.m. 1971, Følling & Norman 1972) menen spontane vorming van anti-insuline-antilichamen bij mensen te hebben aangetoond. Ditzov en medewerkers (1971) vonden alleen antilichamen bij behandelde en onbehandelde diabeten en bij geen van hun 200 controlepersonen. Wij toonden echter binding van insuline aan eiwitten aan bij alle onderzochte personen. Bovendien werd bij de radioimmunologische bepaling van de droge eiwitten (2,5 mg/ml eindconcentratie) slechts een geringe binding (0-10%) van het $[^{131}\text{I}]$ insuline (3-4 $\mu\text{E/ml}$ eindconcentratie) waargenomen. Dit duidt er op dat de binding van toegevoegd insuline niet op de aanwezigheid van antilichamen berust. Ook bij de personen bij wie een hoog gehalte aan endogeen IRM gevonden werd, was de binding van $[^{131}\text{I}]$ insuline niet groter dan bij de andere personen. De gevonden activiteit is dus niet een gevolg van dissociatie van een insuline-antilichaamcomplex. Dit wordt nog bevestigd door het feit dat bij deze personen niet meer grootmoleculair IRM gegenereerd kon worden dan bij andere personen van de betreffende groep.

Samenvattend kan gesteld worden dat met name in de globulinefractie en in mindere mate ook in de albuminefractie van menselijk serum een component voorkomt, die toegevoegd insuline kan binden in een grootmoleculair complex dat bij gel-filtratie over Sephadex G-100 in het globulinegebied wordt geelueerd. Serum van adipeuze patienten blijkt, ongeacht het al of niet aanwezig zijn van diabetes, bijna $1\frac{1}{2}$ maal zoveel insu-

line per mg globulinefractie te kunnen binden. Het is niet duidelijk of dit een gevolg is van een kwalitatieve verandering van de eiwitten in deze fractie dan wel van een verhoogde concentratie van een hierin aanwezige bindende component.

Evenmin is duidelijk waardoor uit plasma verkregen globulinefracties (in tegenstelling tot die uit serum) weinig verschil lieten zien tussen adipeuze patienten en normale controles, terwijl dit verschil wel duidelijk zichtbaar was tussen de albuminefracties van deze categorieën. Mogelijk hangt dit samen met het feit dat de aantallen personen waarvan het plasma werd onderzocht veel kleiner waren dan de serumgroepen, terwijl de spreiding in uitkomsten per groep aanzienlijk was. Wanneer men de in serum en plasma gegenereerde activiteiten per ml uitdrukt en vergelijkt, laten serum en plasma echter globaal genomen hetzelfde beeld zien, namelijk een hogere gegenereerde activiteit in het materiaal van adipeuze diabetische en niet-diabetische patienten.

HOOFDSTUK VIII

SLOTBESCHOUWING

Het in de voorgaande hoofdstukken beschreven onderzoek werd verricht met het doel een studie te maken van de mogelijkheid dat insuline met bloedeiwitten complexen kan vormen.

Door sommige onderzoekers, met name door Antoniades, is gepostuleerd dat een dergelijke complexvorming mogelijk is en dat deze van invloed kan zijn op de biologische werking en de immunologische aantoonbaarheid van het in bloed aanwezige insuline. Deze mogelijkheid is met kracht bestreden door Yalow en Berson (Berson & Yalow 1964, Yalow & Berson 1967).

Met Yalow en Berson zijn wij van mening dat het bestaan van een insuline-bevattend eiwitcomplex slechts aanvaardbaar is indien het hierin aanwezige insuline op basis van zijn specifieke moleculaire kenmerken kan worden aangetoond. Deze kenmerken, die berusten op een combinatie van immunologische en biologische eigenschappen van het insulinemolecuul, zijn geformuleerd in de drie minimum criteria, vermeld aan het eind van Hoofdstuk III. De noodzaak dat gelijktijdig aan deze drie criteria voldaan moet worden, volgt uit het feit dat andere eiwitten dan insuline een kwalitatief vrijwel identieke biologische activiteit kunnen ontplooiën in voor insuline gebruikelijke biologische bepalingssystemen, terwijl zij immunologisch en chemisch volstrekt van insuline afwijken (Froesch e.m. 1967). Ook het omgekeerde is mogelijk. Na verwijdering van de laatste 8 aminozuren van de B-keten van het insulinemolecuul ontstaat het zg. desoctapeptide-insuline, dat geen biologische activiteit bezit, doch nog wel met tegen insuline gerichte antilichamen reageert (Yalow & Berson 1961).

Bij het onderzoek van 11 willekeurige rundersera zoals beschreven in Hoofdstuk V, werd een serum aangetroffen (serum 51119) waarvan de globulinefractie materiaal bevatte, dat volgens bovengenoemde criteria slechts als insuline kan worden beschouwd. Aangezien de in de globulinefractie aanwezige hoeveelheid insuline ongeveer 10-20 maal groter was dan het rechtstreeks meetbare insuline van het onbewerkte serum, moet geconcludeerd worden dat de biologische en immunologische activiteit van dit insuline in het natieve serum gemaskeerd was. Een geval van binding van endogeen insuline aan een serum-eiwit is hiermee onomstotelijk aangetoond. De met de overige

rundersera verkregen resultaten wijzen er echter op dat dit verschijnsel, althans in deze mate, een uitzonderingssituatie is waarvan de oorzaak onduidelijk was.

Wel werden in de overige rundersera in de natte globulinefracties kleine hoeveelheden IRI aangetroffen, die juist boven de grens van het meetbare waren gelegen. Per ml serum werd hier globaal twee maal zoveel grootmoleculair IRI gevonden als het rechtstreeks meetbare IRI-gehalte van de onbewerkte sera. Deze waarneming opent de mogelijkheid dat grootmoleculaire complexvorming van endogeen insuline met gelijktijdige maskering van de immunologische activiteit in zekere mate in ieder runderserum kan optreden. Het definitieve bewijs hiervoor kon echter niet geleverd worden, aangezien de hoeveelheid activiteit in de eiwitfracties te gering was om via nader onderzoek gelijktijdig alle drie criteria te toetsen.

Het onderzoek naar het spontaan voorkomen van een insuline-complex in menselijk serum en plasma leverde eveneens aanwijzingen, doch geen bewijs op voor het regelmatig aanwezig zijn van een gebonden vorm van insuline. In 20 van de 32 onderzochte sera en 11 van de 17 onderzochte plasma's, die afkomstig waren van 39 personen, werd in de droge globulinefracties grootmoleculair IRI gevonden in hoeveelheden die groter waren dan de minimaal detecteerbare hoeveelheid insuline ($5 \mu\text{E/ml}$ plasma of serum). Bij 7 van deze 39 personen werden aanzienlijke hoeveelheden gevonden ($74\text{--}816 \mu\text{E/ml}$), waarvan 3 keer in plasma en 4 keer in serum. Bij rechtstreekse immunologische bepaling van de onbewerkte sera en plasma's werd een aanzienlijk lager IRI-gehalte gevonden. Ook hier zou dus van maskering sprake zijn. Van één van deze 7 personen werd het globuline-eiwit van serum zowel met de radioimmunologische als de biologische bepalingmethode onderzocht. De met antiserum neutraliseerbare biologische activiteit bleek hier vrijwel gelijk te zijn aan het gemeten IRI-gehalte. In dit geval kon dus aan twee van de drie criteria worden voldaan. Gebrek aan materiaal verhinderde hier het onderzoek naar "parallel-line response" ten opzichte van kristallijn insuline.

Niettemin zijn er redenen om ten aanzien van deze resultaten de nodige voorzichtigheid te betrachten. Bij 3 van de 7 personen waarbij veel natief grootmoleculair IRI gevonden werd, was dit materiaal niet gelijktijdig aantoonbaar in uit dezelfde bloedafname verkregen serum en plasma. Bij de overige 4 personen werd dit niet onderzocht. Verder werd bij controlepersoon 5 slechts bij één van de drie bloedafnamen grootmoleculair IRI waargenomen. Natief menselijk grootmoleculair IRI in bevaerd serum en plasma bleek bovendien in de loop van enkele

maanden sterk af te nemen of geheel te verdwijnen.

Samenvattend kan gesteld worden dat de spontane aanwezigheid van insuline in de globulinefractie slechts in het geval van runderserum 51119 met zekerheid is vastgesteld. Het onderzoek met de overige rundersera en menselijk serum en plasma heeft wel aanwijzingen gegeven dat dit verschijnsel in geringe mate in ieder willekeurig serum zou kunnen optreden. Bij 7 personen waarbij spontaan aanwezig grootmoleculair IRM in grotere hoeveelheden werd gevonden, liet de reproduceerbaarheid van dit verschijnsel echter te wensen over. In alle gevallen waarin veel grootmoleculair IRM in de globulinefractie werd aangetroffen, was deze activiteit aanzienlijk hoger dan het IRI-gehalte van het natieve serum of plasma, zodat hier van gemaskeerde activiteit gesproken moet worden.

Aangezien spontane aanwezigheid van goed meetbare hoeveelheden natief grootmoleculair IRM een weinig frequent verschijnsel was, werd de mogelijkheid tot binding van insuline aan serumeiwitten onder in vitro omstandigheden onderzocht. Na een simpele incubatie van serum of plasma met toegevoegd insuline werden in de globulinefractie mE-hoeveelheden insuline-achtig materiaal gevonden. Deze activiteit voldeed aan de drie gestelde criteria voor insuline, terwijl dit materiaal bovendien ten aanzien van drie kwalitatieve parameters voor biologische werking niet van insuline te onderscheiden was. Complexvorming van insuline met serumeiwit onder in vitro omstandigheden was hiermee bewezen. Dit verschijnsel bleek in ieder onderzocht serum of plasma op te treden. Gelfiltratieproeven met Sephadex G-100 en G-200 toonden aan dat het complex kan dissociëren. Deze dissociatie treedt op bij pH 8,5 en wordt bevorderd door lage pH, ureum en behandeling met natriumdodecylsulfaat (SDS). Bij gelfiltratie over Sephadex G-200 blijkt de totaal geëluëerde insuline-activiteit met een factor 1,7 te zijn toegenomen ten opzichte van de rechtstreeks meetbare activiteit van het grootmoleculaire uitgangsmateriaal. Voorbehandeling van dit uitgangsmateriaal met SDS deed de totaal geëluëerde activiteit met een factor 2,6 toenemen.

Deze en andere waarnemingen tonen aan dat de dissociatie van het gevormde complex nimmer compleet is. Een niet nauwkeurig vast te stellen maar zeker niet onaanzienlijk deel van het in het gegenereerde complex aanwezige insuline is niet rechtstreeks immunologisch aantoonbaar en moet dus gemaskeerd zijn.

Over de aard van het gevormde complex kon weinig informatie verkregen worden, met name over de vraag welk serumeiwit hierbij betrokken is. Aangetoond werd dat de vorming van

het complex afhankelijk is van de aanwezigheid van serum of plasma. Ook globuline- en albuminefracties die uit onbehandeld serum of plasma geïsoleerd werden, blijken bij incubatie met insuline grootmoleculair insulinecomplex te vormen. Op gewichtsbasis is eiwit uit de globulinefractie 4-5 maal actiever dan eiwit uit de albuminefractie. Activiteit die in albuminefracties gegenereerd kan worden, blijkt bij gelfiltratie in de globulinefractie van het eluaat te worden teruggevonden. Het is niet duidelijk of dit laatste moet worden toegeschreven aan de aanwezigheid van enig grootmoleculair globuline-eiwit in de albuminefracties, of dat dit een gevolg is van complexvorming met albumine zelf of een eiwit ter grootte van of kleiner dan albumine. Dit zou b.v. een kleinmoleculair α_1 -globuline kunnen zijn. Het is daarom niet uitgesloten dat meer dan één eiwit bij de complexvorming betrokken is.

Uiteraard gaat de aandacht vooral uit naar die eiwitfractie waarin de meeste activiteit gegenereerd kan worden. Dit is de globulinefractie, waarvan de mol. massa op basis van filtratie over Sephadex G-100 minimaal 150.000 moet bedragen. Bij scheiding van gegenereerd serum over Sephadex G-200 wordt zelfs een aanzienlijk deel van de gegenereerde activiteit gevonden in een gebied waar eiwitten met een mol. massa van meer dan 800.000 worden geëluëerd, hetgeen een aanwijzing kan zijn dat macroglobulinen bij de complexvorming betrokken kunnen zijn.

In dit verband is ook van belang dat door verschillende onderzoekers binding van "tracer"-hoeveelheden [^{131}I]insuline aan α_2 -macroglobuline beschreven is (Clausen e.m. 1963, Zahnd & Scheidegger 1963, Geerling & Sirek 1965, Gjedde 1967, Christiansen & Vølund 1971). Niet met insuline behandelde diabeten zouden meer [^{131}I]insuline aan α_2 -macroglobuline binden dan normale controlepersonen (Zahnd & Scheidegger 1963). Pogingen van Keehan en medewerkers (1967) om met de radioimmunologische methode IRI aan te tonen in α_2 -macroglobuline van normaal serum leverden echter geen resultaat op.

Bij eigen, niet vermelde onderzoeken met immunoëlectroforese van runderserum hebben ook wij gevonden dat radioactief insuline gebonden wordt in het α_1 -, α_2 -globulinegebied. Daar wij niet de beschikking hadden over antisera die specifiek gericht waren tegen bepaalde serumcomponenten, kon het insuline-bindende eiwit echter niet geïdentificeerd worden. Bij een kleuring met sudanzwart werd op een plaats die niet onderscheiden kon worden van de plaats waar de radioactiviteit gebonden was, een gekleurde band verkregen. Op grond hiervan lijkt het mogelijk dat althans binding van [^{131}I]insuline aan lipoproteïne

kan optreden. Ook door Kallee (1963) en Christiansen en Volund (1971) is gevonden dat binding van radioactief insuline aan lipoproteïne mogelijk is. Door Perry en medewerkers (1971) is aangetoond dat binding van insuline aan sommige fosfolipiden, o.a. het fosfatidylcholine dat ook in lipoproteïnen voorkomt, mogelijk is. Zou een apolipoproteïne als bindend eiwit optreden, dan zou daarmee ook het feit verklaard kunnen worden dat in de albuminefractie binding van insuline aangetoond kan worden, het vetvrije of bijna vetvrije apoproteïne kan nl. in bloed voorkomen (Levy & Fredrickson 1965, Scanu 1965, Lees 1967).

Uit het voorgaande volgt dat er zeker argumenten zijn aan te voeren dat macroglobulinen bij de complexvorming onder in vitro omstandigheden betrokken kunnen zijn. In Hoofdstuk III is echter reeds opgemerkt dat het merken van insuline met ^{131}I een vrij ingrijpende en zeker niet constante modificatie van het insulinemolecuul betekent. Op ^{131}I insuline gebaseerde gegevens over insuline-bindende eigenschappen van macroglobuline dienen daarom met de nodige voorzichtigheid te worden beoordeeld. De resultaten van onze generatieproeven laten zeker de mogelijkheid open, dat ook andere eiwitten dan macroglobulinen met insuline complexen kunnen vormen.

Belangrijke vragen zijn verder: heeft de waargenomen binding van insuline aan eiwit (d.w.z. het generatiefenomeen) enige specificiteit en kan dit verschijnsel ook in vivo optreden? Indien deze vragen bevestigend zouden moeten worden beantwoord, rijzen nieuwe vragen betreffende de kwantitatieve betekenis van een dergelijk verschijnsel en de mogelijke consequenties hiervan voor de validiteit van rechtstreekse immunologische insulinebepaling in serum of plasma als zodanig. Al deze aspecten houden tevens rechtstreeks of indirect verband met de vraag of het generatiefenomeen, dat in ieder serum of plasma kan worden aangetoond, op hetzelfde principe berust als het verschijnsel van de spontane aanwezigheid van natief grootmoleculair IRM.

Over de specificiteit van de complexvorming bij de generatieproeven in vitro is geen informatie beschikbaar. Een specifiek bindend eiwit zou omschreven kunnen worden als een eiwit met een hogere affiniteit voor insuline dan voor andere substanties, terwijl de hieruit resulterende binding mede bepaald wordt door een specifieke chemische structuur van het insuline en het bindend eiwit. Geen van deze aspecten zijn door ons onderzocht in verband met hieraan verbonden technische problemen.

De mogelijke fysiologische relevantie van het generatiefenomeen is evenmin met zekerheid vast te stellen. Van belang in

dit opzicht is echter, dat na intraveneuze injectie van hoge doses insuline bij de rat grootmoleculair IRM in het plasma kon worden aangetoond. Een probleem is, dat de hierbij gevonden concentratie aan grootmoleculair IRM slechts circa 1% bedroeg van het rechtstreeks meetbare plasma IRI-gehalte op het tijdstip van de bloedafname. Dezelfde of nog iets lagere opbrengst aan grootmoleculair IRM werd waargenomen bij de generatieproeven in vitro. In beide gevallen werden echter zeer onfysiologische insulineconcentraties toegediend c.q. toegevoegd.

Aangezien in serum of plasma een zekere begrensde bindingscapaciteit voor insuline aanwezig geacht mag worden, kan verondersteld worden dat het percentage te genereren grootmoleculair IRM bij gebruik van geringere hoeveelheden toegevoegd insuline zal stijgen. De aangetoonde dissocieerbaarheid van het complex wijst immers op het bestaan van een evenwichtsreactie tussen vrij en gebonden insuline. De technische problemen (vooral in de sfeer van de recovery) verbonden aan de toepassing van lage concentraties toegevoegd insuline waren er oorzaak van dat de laagste concentratie die in vitro onderzocht kon worden 10 mE/ml serum bedroeg, hetgeen 100-1000 maal hoger is dan het fysiologische concentratiegebied. Bij deze concentratie bleek de procentuele opbrengst aan rechtstreeks meetbaar grootmoleculair IRM nog steeds minder dan 1% te bedragen. Hierbij dient echter te worden opgemerkt, dat na herfiltratie van globuline-eiwit over Sephadex G-200 in ieder geval 2,5 maal zoveel insuline kon worden aangetoond dan in het eiwitmateriaal van een eerste G-200 scheiding. De werkelijke procentuele opbrengst aan grootmoleculair IRM na incubatie met insuline moet dus meer dan 1% bedragen, maar hoeveel meer is niet aan te geven. Het is ons immers niet gelukt een volledige dissociatie van het complex te bewerkstelligen.

Op grond van deze overwegingen moet daarom wel degelijk rekening gehouden worden met de mogelijkheid dat bij fysiologische insulineconcentraties een niet onbelangrijk deel van het totaal aanwezige insuline in een complex gebonden is. Een suggestie in deze richting kan zijn dat globulinefracties van niet met insuline behandelde rundersera (die met uitsluiting van kleinmoleculair insuline verkregen waren) per ml serum minstens evenveel IRM bevatten als het IRI-gehalte van het serum als zodanig vóór de scheidingsprocedure.

Indien wij ter wille van de discussie er van uitgaan dat het bovenstaande inderdaad het geval zou zijn, rijst onmiddellijk de vraag welke consequenties hieraan verbonden zouden kunnen zijn voor de validiteit van de radioimmunologische bepaling van IRI in plasma of serum als zodanig. Wij zijn geneigd de betekenis

hiervan betrekkelijk gering te taxeren. De radioimmunologische bepaling houdt immers in dat plasma of serum in een verdunning van 10 maal wordt samengebracht met een antilichaamconcentratie die in staat is over een periode van 3-4 dagen 60-70% van $\pm 4 \mu\text{E}$ [^{131}I]insuline per ml in een antigeen-antilichaam-complex te binden. De affiniteit van de bindingsplaatsen van het antilichaam is groot ten opzichte van insuline, de totale bindingscapaciteit in het bepalingssysteem is echter gering. Zou het te bepalen monster in 10-voudige verdunning $10 \mu\text{E}/\text{ml}$ vrij (kleinmoleculair) insuline bevatten, dan wordt de totale concentratie gemerkt en niet-gemerkte insuline in het bepalingssysteem $14 \mu\text{E}/\text{ml}$. Onder deze omstandigheden wordt circa 30% van het gemerkte en niet-gemerkte insuline gebonden, d.w.z. ongeveer $10 \mu\text{E}/\text{ml}$ wordt niet aan antilichaam gebonden. Eventueel aanwezig endogeen bindend eiwit blijft hier dus in evenwicht met dezelfde concentratie ongebonden insuline als vóór toevoeging van het antilichaam, zodat het onwaarschijnlijk is dat toevoeging van antilichamen de dissociatie van een insuline-eiwitcomplex zal bevorderen. Wanneer de affiniteit voor insuline van een natief insuline-bindend eiwit hoog is (b.v. vergelijkbaar met die van antilichaam) zal de immunologische methode onder alle omstandigheden slechts het vrije, kleinmoleculaire insuline in plasma of serum bepalen.

Onze resultaten met IRM-bevattende globulinefracties (natief en gegenereerd) suggereren dat na gelfiltratie en eventuele verdere procedures (pH verlaging, ureum, SDS) slechts gedeeltelijke dissociatie van het complex optreedt. Dit zou er op wijzen dat eventueel aan serumeiwit gebonden insuline hierin met hoge affiniteit gebonden is. In dat geval mag men ook verwachten dat een 10-voudige verdunning van een plasma- of serummonster in het immunologisch bepalingssysteem weinig tot de dissociatie van een complex zal bijdragen.

Onze resultaten bevatten verder verschillende aanwijzingen dat ook de biologische activiteit van het niet-gedisassocieerde IRM in de globulinefracties gemaskeerd was. De gemaskeerde immunologische activiteit van het insuline in het afwijkende runder serum 51119 was in het natieve serum niet met de biologische methodes aantoonbaar, doch eerst na isolatie (en dissociatie?) van het complex. Verder bleek de met antiserum neutraliseerbare biologische activiteit van gegenereerde globulinefracties overeen te stemmen met het rechtstreeks hierin immunologisch aantoonbare insuline. Bij verdere bewerking bleken dergelijke fracties tot 2,6 maal zoveel IRI te bevatten als bij aanvankelijke rechtstreekse bepaling gevonden werd. Ook van dit extra aanwezige materiaal was de biologische activiteit dus gemaskeerd.

Op grond hiervan lijkt het aannemelijk te veronderstellen dat de immunologische bepaling van plasma of serum vrijwel uitsluitend het hierin aanwezige biologisch actieve, niet-gebonden insuline zal bepalen. Daarmee zou de fysiologische en diagnostische betekenis van deze bepalingsmethode dus onaantast zijn. Het langs immunologische en biologische weg vastgestelde maseringsverschijnsel maakt het bovendien waarschijnlijk dat in bloed circulerend gebonden insuline ook bij lage concentraties aan vrij insuline niet gemakkelijk dissocieert. De bijdrage van dit materiaal aan fysiologische regulaties is daarom vooralsnog onduidelijk en mogelijk zelfs gering. De regulatie van de insulineafgifte uit het pancreas zal ons inziens voornamelijk afhankelijk blijven van de snelle bloedsuikerverlagende werking van het rechtstreeks biologisch actieve, ongebonden insuline.

In de voorgaande beschouwing neemt de hoge affiniteit waarmee insuline aan serum-eiwit gebonden lijkt te zijn een essentiële plaats in. Dit introduceert de vraag wat dan wel de eventuele aard zou kunnen zijn van het eiwit dat in ieder serum of plasma aanwezig lijkt te zijn en waarvan de affiniteit voor insuline op één lijn zou moeten worden gesteld met die van specifieke, tegen insuline gerichte antilichamen. Juist wegens deze hoge affiniteit rijst de vraag of het hier niet één of meerdere eveneens specifiek bindende eiwitten kan betreffen, die niet tot de antilichamen gerekend zouden moeten worden. Op basis van onze eerder in dit hoofdstuk gegeven omschrijving van een specifiek bindend eiwit zou een dergelijk eiwit een op structurele kenmerken van het insulinemolecuul afgestemde structuur moeten bezitten. Eiwitten die aan deze omschrijving kunnen voldoen zouden volgens recente inzichten deel kunnen uitmaken van, of identiek zijn met de in de celwand gelegen specifieke receptorstructuur voor insuline. Het bestaan van een dergelijke moleculaire structuur met een hoge affiniteit voor insuline is aannemelijk gemaakt door de recente onderzoeken van Cuatrecasas (1971, 1971a). Met affiniteitschromatografie van membraanfracties, waarbij membraancomponenten juist op grond van hun affiniteit voor insuline worden geïsoleerd, kon door hem worden aangetoond dat een insuline-bindend eiwit in de plasmamembraan van levercellen aanwezig is (Cuatrecasas 1972). De bindingskarakteristieken van dit eiwit en die van plasmamembranen voor insuline komen met elkaar overeen en liggen in dezelfde orde van grootte als die voor binding aan specifiek tegen insuline gerichte antilichamen. Indien de plasmamembraan van iedere insuline-gevoelige cel specifiek bindende eiwitten voor insuline bevat, is het niet uitgesloten te achten dat het constant te gronde gaan van cellen in het lichaam aanleiding is

tot het in circulatie komen van kleine hoeveelheden van deze specifiek insuline-bindende eiwitten. Een overeenkomstige situatie is ook bekend voor het alkalisch fosfatase, dat eveneens een membraan-gebonden eiwit is (Daems & Persijn 1964). Nader onderzoek zal moeten aantonen of deze speculatieve maar ongetwijfeld aantrekkelijke verklaring van het verschijnsel van insuline-binding aan serumewit een grond van waarheid heeft.

Daarnaast dient zonder twijfel rekening gehouden te worden met de mogelijkheid dat met name bij het generatiefenomeen, wegens de hierbij toegepaste zeer hoge insulineconcentraties, ook andere minder specifiek bindende eiwitten betrokken zijn.

SAMENVATTING

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek had tot doel na te gaan of insuline eventueel in een gebonden vorm in bloed zou kunnen voorkomen.

In het eerste hoofdstuk zijn de bepalingsmethoden voor insuline beschreven. De biologische bepalingsmethoden zijn gebaseerd op het stimulerend effect dat insuline heeft op het koolhydraat- en vetmetabolisme van insuline-gevoelige weefsels. Deze methoden hebben alle het nadeel dat zij niet specifiek zijn voor insuline. Men meet nl. de som van alle stimulerende en remmende effecten op de gekozen parameter (insuline-achtige activiteit). Dit komt o.a. tot uitdrukking in het feit dat slechts 5-30% van de insuline-achtige activiteit die in een plasma- of serummonster gemeten wordt, met anti-insulineserum geneutraliseerd kan worden. Naast de biologische bepalingsmethoden is aan het eind van de vijftiger jaren de immunochemische bepalingsmethode ontwikkeld (Yalow & Berson 1960). Deze methode, die gebaseerd is op de competitie van radioactief-gemerkt en niet-gemerkt insuline voor de bindingsplaatsen van tegen insuline gerichte antilichamen, is zeer gevoelig, zeer specifiek en kan een vrij groot aantal monsters in één keer bepalen.

In de Hoofdstukken II en III is de literatuur besproken waarin onderzoek betreffende het al dan niet voorkomen van een gebonden vorm van insuline is vermeld. Door een aantal onderzoekers kon uit serum of serumeiwitfracties waarin geen met anti-insulineserum neutraliseerbare activiteit aantoonbaar was door behandeling met zure alcohol (Moloney 1962, Steinke e.m. 1962, Samaan e.m. 1963a, Antoniadis e.m. 1965, Schoeffling e.m. 1965) of dialyse tegen water (Lyngsøe 1963, Gjedde 1968) insuline-activiteit in een met antilichaam neutraliseerbare vorm verkregen worden. Door enkele onderzoekers kon in eiwitfracties die verkregen waren door gelfiltratie van serum, met de radioimmunologische bepalingsmethode insuline worden aangetoond (Steinke & Soeldner 1965, Cameron e.m. 1966, Kajinuma e.m. 1969). Ook door gebruik te maken van [^{131}I]insuline heeft men getracht binding van insuline aan serumeiwitten aan te tonen (Clausen e.m. 1963, Prout e.m. 1963, Zahnd & Scheidegger 1963, Geerling & Sirek 1965, Gjedde 1967). Hoewel deze onderzoeken aanwijzingen hebben opgeleverd voor het bestaan van een gebonden vorm van insuline, is hun onderlinge samenhang qua uitvoering en gebruikte methoden te gering om hieruit een duidelijk beeld te kunnen verkrijgen. Verschillende van de hierbij verkregen resultaten konden bovendien niet door anderen bevestigd worden.

In wezen is het probleem omtrent het wel of niet bestaan van een aan eiwit gebonden vorm van insuline in bloed te herleiden tot een vraagstelling met betrekking tot de moleculaire grootte van het circulerend insuline. Dit aspect wilden wij kritisch toetsen. Behalve een grotere mol. massa hebben wij een drietal criteria gehanteerd waaraan in een complex aanwezig insuline-achtig materiaal ten minste moet voldoen om het als insuline te kunnen bestempelen:

1. Het materiaal moet detecteerbaar zijn met een voor insuline specifieke immunologische bepalingsmethode.
2. Het materiaal moet een dosis-afhankelijke biologische werking bezitten, welke overeenkomt met die van gezuiverd insuline en die gekenmerkt wordt door een z.g. "parallel-line response".
3. De biologische werking van het materiaal moet onderdrukt kunnen worden met tegen insuline gerichte antilichamen.

Nadat in Hoofdstuk IV de bij dit onderzoek algemeen gebruikte methoden zijn beschreven volgen in de Hoofdstukken V, VI en VII eigen experimenten. In Hoofdstuk V is aangetoond dat met behulp van gelfiltratie over Sephadex G-100 een goede scheiding wordt verkregen tussen de serumeiwitten en endoogeen of toegevoegd kleinmoleculair insuline. Hierbij bleek dat ook in de globulinefractie een geringe hoeveelheid radioimmunologisch bepaalde activiteit aangetoond kon worden.

Het voorkomen van immunologisch en biologisch bepaalde insuline-achtige activiteit in eiwitfracties werd uitvoerig getest in 11 willekeurige rundersera. De resultaten die verkregen werden met 10 van deze sera laten zien, dat in het globulinegebied geringe hoeveelheden immunoreactief materiaal aantoonbaar waren. In een afwijkend serum werd echter in de eiwitfracties ongeveer twintig maal zoveel immunoreactief materiaal aangetoond als in het onbehandelde serum was bepaald. Dit materiaal voldeed geheel aan de voor insuline gestelde criteria.

In Hoofdstuk VI zijn experimenten die betrekking hebben op de vorming en dissociatie van een grootmoleculair insulinecomplex beschreven. Door serum met toegevoegd insuline (1 E/ml, 10 mE/ml) te incuberen werd een grootmoleculair complex verkregen, dat vooral met de globulinefractie werd geëlueerd. Gedeeltelijke dissociatie van het complex trad spontaan op en deze werd bevorderd door pH verlaging, ureum en natrium dodecylsulfaat (SDS). Het was niet mogelijk door behandeling met zuur, ureum of SDS het immunoreactieve materiaal volledig uit het eiwitcomplex vrij te maken. Bij herfiltratie van het grootmoleculaire complex over Sephadex G-200 werd in het eluaat meer activiteit aangetoond dan in het uitgangsmateriaal was be-

paald (toename gemiddeld 70%). Wanneer het materiaal vóór de herfiltratie met SDS was behandeld, was de toename van de immunoreactiviteit in het eluaat nog groter (160%). Deze experimenten geven aan dat in het gegenereerde complex meer insuline gebonden kan zijn dan er rechtstreeks in aantoonbaar is.

Hoofdstuk VII geeft resultaten weer die verkregen werden met humaan materiaal. In enkele gevallen werden in droog globuline-eiwit, dat verkregen was uit plasma of serum, hoeveelheden immunoreactief materiaal aangetoond die enkele malen groter waren dan rechtstreeks in het plasma of serum was bepaald. Van de persoon met het hoogste IRM-gehalte (816 $\mu\text{E}/\text{ml}$ serum) werd het globuline-eiwit uitvoeriger getest. Immunologisch was het hierin aanwezig immunoreactieve materiaal niet van insuline te onderscheiden. Het materiaal was biologisch werkzaam en het met antiserum neutraliseerbare deel van de biologische activiteit kwam goed overeen met de immunologisch in het medium bepaalde activiteit (44 resp. 50 $\mu\text{E}/\text{ml}$). Het tweede criterium kon in dit geval niet worden getoetst wegens gebrek aan materiaal.

Bij generatieproeven die met droge eiwitfracties van menselijk plasma en serum werden uitgevoerd, bleek dat in albuminefracties die verkregen waren uit plasma van adipeuze patienten, meer insuline gebonden werd dan in soortgelijke fracties van normale controlepersonen. De gebonden activiteit werd bij chromatografie van deze albuminefracties in het globulinegebied geëluëerd. Werd van serum uitgegaan, dan werd in globuline-eiwitfracties van de adipeuze patienten meer insuline gebonden dan bij de normale controles. Het is niet bekend waardoor dit verschil tussen de plasma- en serumeiwitfracties werd veroorzaakt. Berekend per ml uitgangsmateriaal vertoonden plasma en serum echter hetzelfde beeld, nl. dat bij adipeuze personen meer insuline gebonden kon worden dan bij de normale controles. De betekenis van dit verschijnsel is onduidelijk.

Uit de in dit proefschrift beschreven experimenten blijkt dat het mogelijk is door incubatie van serum of serumeiwitfracties met insuline een insuline-eiwitcomplex met grote mol. massa te genereren. Hoewel de opbrengst aan complex procentueel gezien slechts gering is, menen we te mogen concluderen dat binding van insuline aan een of meerdere eiwitten mogelijk is. Tevens werden aanwijzingen verkregen dat een soortgelijk of hiermee verwant complex spontaan in bloed kan voorkomen. Met de radioimmunologische bepalingsmethode kon in enkele gevallen in droge, niet met insuline behandelde globulinefracties immunoreactief materiaal worden aangetoond. In één runderserum werd zelfs endogeen grootmoleculair immunoreactief materiaal aange-

toond, dat geheel voldeed aan de door ons gestelde criteria en dat op grond hiervan dus als een gebonden vorm van insuline moet worden beschouwd. Bij één humaan monster kon de in de globulinefractie spontaan aanwezige activiteit slechts aan twee van de gestelde criteria getoetst worden, hetgeen voor ons echter onvoldoende was om dit zonder reserve als gebonden insuline aan te duiden.

In de slotbeschouwing (Hoofdstuk VIII) is getracht de resultaten van ons onderzoek onder een gemeenschappelijke noemer te brengen. Het feit dat het in geïsoleerde, gegenereerde eiwitfracties aanwezige insuline niet volledig hieruit kan worden vrijgemaakt en dat ook de aanwezigheid van natief grootmoleculair IRM in serum gemaskeerd is, suggereert dat het hier een complex met een hoge affiniteit voor insuline betreft, dat slechts onder bijzondere voorwaarden dissociatie van betekenis ondergaat. Aan de hand van verschillende overwegingen is geargumenteed dat de validiteit van de radioimmunologische bepaling van insuline in plasma of serum als zodanig, door de aanwezigheid van een dergelijk complex niet aangetast behoeft te worden. Deze bepalingsmethode zal hoofdzakelijk het in plasma of serum aanwezige biologisch actieve, niet-gebonden insuline bepalen.

SUMMARY

The aim of the study described in this thesis was to investigate whether bovine and human serum or plasma may contain some protein-bound form of insulin.

In Chapter I a survey is given of the available methods for the detection of insulin in blood. Various bioassay procedures which have been devised for this purpose, are based on the stimulating action of insulin on carbohydrate and fat metabolism of insulin-sensitive tissues. Since these procedures will measure the sum of all stimulatory and inhibitory effects of insulin and other serum components (insulin-like activity), none of these methods will accurately measure the insulin content. This is also demonstrated by the fact that only 5-30% of the insulin-like activity in plasma or serum can be neutralized by excess anti-insulin serum (suppressible insulin-like activity). Radio-immunologic assay procedures, on the other hand, are highly specific and large numbers of samples can be measured with great sensitivity. The latter methods are based on competition between labelled and unlabelled insulin for the binding sites of insulin antibodies.

In the Chapters II and III the literature dealing with binding of insulin to serum constituents has been reviewed. Treatment with acid alcohol or dialysis against water has been reported to cause the appearance of antibody suppressible insulin-like activity in serum or serum protein fractions which did not exhibit this kind of activity prior to this treatment (Moloney 1962, Steinke et al. 1962, Lyngsøe 1963, Samaan et al. 1963a, Antoniadis et al. 1965, Schoeffling et al. 1965, Gjedde 1968). In some cases immunoreactive insulin (IRI) has been demonstrated in protein fractions obtained by gel filtration of serum (Steinke & Soeldner 1965, Cameron et al. 1966, Kajinuma et al. 1969). Attempts have also been made to demonstrate insulin binding to serum proteins in studies with [^{131}I] insulin (Clausen et al. 1963, Prout et al. 1963, Zahnd & Scheidegger 1963, Geerling & Sirek 1965, Gjedde 1967, Christiansen & Vølund 1971). However, the experimental evidence in support of the concept of protein-binding of serum insulin is generally considered as being inconclusive. This is due to various questionable aspects of the methods employed in these studies and to poor reproducibility of some of the results.

Essentially, the controversial concept of a protein-bound form of insulin can be reduced to a problem related to the molecular size of circulating insulin. The critical appraisal of this particular aspect was decisive in the design of our exper-

imental approach. In addition, it was considered of fundamental importance to adopt the following minimum criteria for designating any insulin-like material in high molecular weight complexes as insulin:

1. The material should be detectable by radioimmunoassay for insulin.
2. The material should exhibit a parallel-line response against a crystalline insulin standard in the epididymal fat pad assay for insulin activity.
3. Its biological activity in the adipose tissue assay should be suppressible by excess anti-insulin serum.

The methods used in our experiments have been described in Chapter IV. In Chapter V it is demonstrated that a satisfactory separation between low molecular weight insulin and serum proteins was obtained when pancreatic venous serum or insulin-enriched peripheral serum was passed over Sephadex G-100. Nevertheless, the globulin fraction was found to contain small amounts of immunoassayable material. The possible occurrence of immunoassayable and bioassayable insulin-like material in Sephadex G-100 protein fractions was extensively tested in 11 random bovine sera. Ten of these sera again showed the presence of small amounts of immunoreactive material in the globulin fractions ($47 \pm 9 \mu\text{U/ml}$ of serum), which equalled or surpassed the directly assayable IRI content of the native sera ($24 \pm 3.5 \mu\text{U/ml}$). The globulin-associated activity was too low to be detectable by adipose tissue assay. However, in one clearly aberrant serum the globulin fraction was found to contain $306 \mu\text{U}$ of IRI per ml of serum. This fraction appeared to exert an equivalent suppressible insulin-like activity in the adipose tissue assay. The high molecular material contained in this serum completely satisfied our criteria for insulin. The IRI content of the native serum amounted to $15 \mu\text{U/ml}$ and its suppressible insulin-like activity to $46 \mu\text{U/ml}$. The presence of insulin binding antibodies and accidental contamination with insulin could be excluded. Accordingly, it was concluded that this aberrant serum contained a masked form of endogenous insulin.

The generation of a high molecular weight insulin complex in normal bovine sera has been described in Chapter VI. The complex which elutes with the globulin fraction, is formed during incubation of serum with added crystalline insulin (1 U/ml and 10 mU/ml). The insulin activity of the complex was demonstrated by immunoassay, epididymal fat pad assay and the intraperitoneal assay according to Rafaelsen et al. (1965) and appeared to satisfy our criteria for insulin. Per ml of serum milli-Unit quantities of complexed insulin could be generated without

difficulty. However, the per cent yield of directly immunoassayable activity in the complex was low when related to the quantity of added insulin (less than 1%). The presence of a similar complex was also observed in plasma of rats 30 min. after intravenous injection of insulin 10 I.U./100 g body weight.

Spontaneous partial dissociation was observed when the isolated complex was rechromatographed on Sephadex G-100 or G-200. Dissociation was enhanced by treatment of the complex with urea, SDS or lowering of the pH. Complete dissociation of the complex could not be obtained. After refiltration on Sephadex G-200 more immunoassayable activity was recovered in the eluate than initially detectable in the complex by direct immunoassay (mean gain 70%). When the material was refiltered after treatment with 0.4% SDS the recovery of immunoassayable activity in the eluate even increased to 260%.

The results demonstrate that only part of the activity in the complex can be revealed by direct immunoassay.

In Chapter VII the results have been described of an investigation on human serum and plasma samples. In a number of cases endogenous immunoassayable insulin-like material could be detected in the dried Sephadex G-100 globulin fractions in amounts which were several times higher than the IRI content of the original plasma or serum. One globulin fraction with the highest amount of immunoreactive material (816 μ U/ml of serum) could be tested more extensively. Immunologically there seemed to be no difference between the immunoreactive material in this fraction and human insulin. The material was biologically active and the antibody suppressible activity was in good agreement with the immunoassayable activity. Nevertheless, the spontaneous presence of endogenous high molecular immunoreactive material in human plasma or serum appeared to be a variable and inconsistent phenomenon.

In generation experiments with isolated dried proteins of human plasma more insulin could be bound to protein of the albumin fraction of obese patients than to similar fractions of normal control persons. However, when serum was used instead of plasma, the globulin fraction of the obese patients was found to bind more insulin than the corresponding fraction in normal controls. This difference between plasma and serum cannot be explained. On chromatography of insulin-treated protein fractions on Sephadex G-100, the generated activity was always eluted in the globulin region. A more uniform picture was obtained when the total amount of generated activity was expressed per ml of serum or plasma. On this basis the mean overall binding of insulin to the proteins of plasma or serum of

obese patients was twice as high as observed in normal controls. The nature and significance of this phenomenon is unclear.

The experiments described in this thesis demonstrate that an insulin-protein complex can be generated by incubation of serum or serum protein fractions with insulin. The high molecular activity, which satisfies immunologic and biologic criteria for insulin, mainly resides in the globulin fraction. Evidence was also obtained suggesting that a similar or related complex may be present in small amounts in any normal untreated plasma or serum. In a number of cases the spontaneous presence of immunoreactive material in the globulin fraction was demonstrated. In one bovine serum a relative large amount of endogenous globulin-associated material was found which satisfied our three criteria for insulin and which for that reason was considered as a bound form of insulin. One human serum contained similar endogenous high molecular activity which could only be tested against two of our criteria. In both cases the presence of this material was masked in the native serum.

In Chapter VIII the results of our experiments have been discussed. It was emphasized that the activity contained in protein fractions of insulin-treated serum cannot be fully dissociated from the isolated complex. In addition, the immunologic and biologic activity of endogenous complex is masked to a considerable extent in the native serum. This suggests that these phenomena involve high-affinity binding of insulin to certain proteins in the globulin fraction and that partial dissociation of the complex will only occur under particular conditions. On this basis it is considered unlikely that the presence of such complexes in serum or plasma will affect the validity of direct immunoassay of plasma or serum samples. This assay procedure most likely will only detect the free and biologically active low molecular weight insulin.

LITERATUUR

- Anderson, E., E. Lindner & V. Sutton - Am. J. Physiol. 149, 350 (1947).
- Antoniades, H. N. - Endocrinology 68, 7 (1961).
- Antoniades, H. N. - Diabetes 12, 365 (1963).
- Antoniades, H. N. - Endocrinology 84, 1268 (1969).
- Antoniades, H. N., P. M. Beigelman, R. B. Pennell, G. W. Thorn & J. L. Oncley - Metabolism 7, 266 (1958).
- Antoniades, H. N., J. A. Bougas, R. Camerini-Davalos, H. M. Pyle, S. J. Mazurkie, O. Lozano-Castaneda & A. Marble - N. Engl. J. Med. 269, 386 (1963).
- Antoniades, H. N. & S. N. Gershoff - Endocrinology 78, 1079 (1966).
- Antoniades, H. N. & K. Gundersen - Endocrinology 68, 36 (1961).
- Antoniades, H. N., K. Gundersen, P. M. Beigelman, H. M. Pyle & J. A. Bougas - Diabetes 11, 261 (1962).
- Antoniades, H. N., A. M. Huber, B. R. Boshell, C. A. Saravis & S. N. Gershoff - Endocrinology 76, 709 (1965).
- Antoniades, H. N., A. M. Huber & S. N. Gershoff - Diabetologia 1, 195 (1965a).
- Antoniades, H. N. & J. D. Simon - Diabetes 21, 930 (1972).
- Arquilla, E. R. & A. B. Stavitsky - J. Clin. Invest. 35, 458 (1956).
- Ball, E. G., D. B. Martin & O. Cooper - J. Biol. Chem. 234, 774 (1959).
- Banerjee, R. N. & K. Gibson - J. Endocrinol. 25, 145 (1962).
- Banting, F. G. & C. H. Best - J. Lab. Clin. Med. 7, 251 (1922).
- Banting, F. G., W. R. Franks & S. Gairns - Am. J. Psychiatry 95, 562 (1938).
- Barral, Ph. & J. Roux - C. R. Soc. Biol. (Paris) 106, 292 (1931).
- Barron, C. N. - Acta Anat. 36, 344 (1959).
- Beck, L. V., D. S. Zaharko, N. Roberts, T. McNeil, C. King & R. Blankenbaker - Life Sci. 3, 545 (1964).
- Beigelman, P. M., H. N. Antoniades, F. C. Goetz, A. E. Renold, J. C. Oncley & G. W. Thorn - Metabolism 5, 44 (1956).
- Beigelman, P. M. & I. S. Onoprienko - Diabetes 8, 438 (1959).
- Berns, A. W., M. C. Curry & H. T. Blumenthal - Fed. Proc. 24, no. 2 part I, 243 (1965).
- Berson, S. A. & R. S. Yalow - Ann. N. Y. Acad. Sci. 70, 56 (1957).
- Berson, S. A. & R. S. Yalow - Ann. N. Y. Acad. Sci. 82, 338 (1959).
- Berson, S. A. & R. S. Yalow - Am. J. Med. 31, 874 (1961).
- Berson, S. A. & R. S. Yalow, in Immunoassay of Hormones. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, vol. 14, p. 182. Ed. G. E. W. Wolstenholme & M. P. Cameron. London: J. & A. Churchill 1962.

- Berson, S.A. & R.S. Yalow - Second International Congress on Endocrinology, London 1964. Excerpta Medica Internat. Congress Series No 83, p.332.
- Berson, S.A. & R.S. Yalow - Diabetes 14, 549 (1965).
- Berson, S.A. & R.S. Yalow - Clin.Chim.Acta 22, 51 (1968).
- Berson, S.A., R.S. Yalow, A. Bauman, M.A. Rothschild & K. Newerly - J.Clin.Invest. 35, 170 (1956).
- Bolinger, R.E., H. v. d. Geld & A.F. Willebrands - Metabolism 8, 39 (1959).
- Bornstein, J. - Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci. 28, 87 (1950).
- Bornstein, J. & R.D. Lawrence - Br.Med.J. II, 1541 (1951).
- Bornstein, J. & P. Trehwella - Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci. 28, 569 (1950).
- Bouman, P.R. & W. Dermer - Acta Endocrinol. (Kbh.) 35, 541 (1960).
- Bouman, P. R., W. Konijnendijk & A. Jansz - Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. 13, 100 (1965).
- Bray, G.A. - Anal. Biochem. 1, 279 (1960).
- Brugsch, H. & H. Horsters - Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 148, 295 (1930).
- Brunfeldt, K. - Science Tools 12, 5 en 17 (1965).
- Brunfeldt, K. - Acta Med. Scand. (Suppl.) 476, 53 (1967).
- Brunfeldt, K., B.A. Hansen & K.R. Jørgensen - Acta Endocrinol. (Kbh.) 57, 307, (1968).
- Burgi, H., K. Kopetz, K. Schwarz & E.R. Froesch - Lancet II, 314 (1963).
- Burgi, H., W.A. Müller, R.E. Humbel, A. Labhart & E.R. Froesch - Biochim. Biophys. Acta 121, 349 (1966).
- Burgi, H., E.B. Ramseier, E.R. Froesch, P. Bally & A. Labhart - Helv. Med. Acta 29, 527 (1962).
- Burn, J. H., D. J. Finney & L. G. Goodwin - Biological Standardization, Oxford University Press, second edition 1952.
- Cahill, G. F., B. LeBoeuf & A. E. Renold - J. Biol. Chem. 234, 2540 (1959).
- Cameron, J.S., D.R. Boyns, R.J. Jarrett & H. Keen - Diabetologia 2, 91 (1966).
- Cannon, W.B., M.A. McIver & S.W. Bliss - Am.J. Physiol. 69, 46 (1924).
- Castrillon, A.M., M.C. Garcia-Fernandez, R.R. Candela & J.L. R-Candela - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 172 (1962).
- Catt, K. J., H.D. Niall & G.W. Tregear - Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 45, 703 (1967).
- Chao, P. Y., J. H. Karam & G. M. Grodsky - Diabetes 14, 27 (1965).
- Christiansen, Aa. H. & Aa. Vólund - Diabetologia 7, 475 (1971).

- Clausen, J., F. Gjedde & K. Jørgensen - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 112, 778 (1963).
- Cohn, E. J., L. E. Strong, W. L. Hughes, D. J. Mulford, J. N. Ashworth, M. Melin & H. L. Taylor - *J. Am. Chem. Soc.* 68, 459 (1946).
- Colquhoun, D. - *Lectures on Biostatistics*, Clarendon Press, Oxford, 1971.
- Corcos, J. M. & Z. Ovary - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 119, 142 (1965).
- Cuatrecasas, P. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1264 (1971).
- Cuatrecasas, P. - *J. Biol. Chem.* 246, 7265 (1971a).
- Cuatrecasas, P. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 1277 (1972).
- Daems, W. Th. & J.-P. Persijn, in *West-European Symposia on Clinical Chemistry*, Gent 1964, vol. 4, p. 98. Ed. P. Ruyssen & L. Vandendriessche. Elsevier Publishing Company 1965.
- Ditschuneit, H., R. Cuendet & E. F. Pfeiffer - *Pathol. Biol. (Paris)* 12, 148 (1964).
- Ditzov, S., I. Pencev, D. Andreev, L. Sirskov & N. Tarkolev - *Diabetologia* 7, 477 (1971).
- Egdahl, R. H. & H. Goldberg - *Surg. Gynecol. Obstet.* 114, 202 (1962).
- Engel, F. L. & J. L. Scott - *Endocrinology* 46, 574 (1950).
- Ensinck, J. W., S. S. Solomon, P. L. Poffenbarger & R. H. Williams - *Sixth Congress of the International Diabetes Federation*, Stockholm 1967. *Excerpta Medica Internat. Congress Series* No 172 pp. 221-232.
- Fawcett, D. W. - *Endocrinology* 42, 454 (1948).
- Fireman, P., W. E. Vannier & H. C. Goodman - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115, 845 (1964).
- Følling, I. & N. Norman - *Diabetes* 21, 814 (1972).
- Franckson, J. R. M., W. Malaisse, Y. Arnould, E. Rasio, H. A. Ooms, E. Balasse, V. Conard & P. A. Basténie - *Diabetologia* 2, 96 (1966).
- Frank, B. H., A. H. Pekar & A. J. Veros - *Diabetes* 21, Suppl. 2, 486 (1972).
- Froesch, E. R., H. Bürgi, W. A. Müller, R. E. Humbel, A. Jakob & A. Labhart, in *Recent Progress in Hormone Research*, vol 23, p. 565. Ed. G. Pincus. Academic Press 1967.
- Froesch, E. R., H. Bürgi, E. B. Ramseier, P. Bally & A. Labhart - *J. Clin. Invest.* 42, 1816 (1963).
- Froesch, E. R., W. A. Müller, H. Bürgi, M. Waldvogel & A. Labhart - *Biochim. Biophys. Acta* 121, 360 (1966).
- Ganrot, P. O., K. Gydell & H. Ekelund - *Acta Endocrinol. (Kbh.)* 55, 537 (1967).
- Geerling, H. & O. V. Sirek - *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 43, 885 (1965).

- Gellhorn, E., J. Feldman & A. Allen - *Endocrinology* 29, 137 (1941).
- Gemmell, C. L. - *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 68, 329 (1941).
- Gener-Segui, J. & A. J. Wolfe - *Diabetes* 15, 894 (1966).
- Genuth, S., L. A. Frohman & H. E. Lebovitz - *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 1043 (1965).
- Gershoff, S. N., N. L. Weich & H. N. Antoniades - *Diabetes* 19, 296 (1970).
- Gjedde, F. - *Acta Physiol. Scand.* 70, 69 (1967).
- Gjedde, F. - *Acta Endocrinol. (Kbh.)* 57, 478 (1968).
- Gliemann, J. - *Diabetes* 14, 643 (1965).
- Gliemann, J. - *Diabetologia* 3, 382 (1967).
- Goetz, F. C., P. M. Beigelman & G. W. Thorn - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86, 484 (1954).
- Gordis, E. - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103, 542 (1960).
- Gozariu, L., O. Florescu & J. Madar - *Endokrinologie* 50, 36 (1966).
- Grodsky, G. M. & P. H. Forsham - *J. Clin. Invest.* 39, 1070 (1960).
- Groen, J., H. v. d. Geld, R. E. Bolinger & A. F. Willebrands - *Diabetes* 7, 272 (1958).
- Groen, J., C. E. Kamminga, A. F. Willebrands & J. R. Blickman, - *J. Clin. Invest.* 31, 97 (1952).
- Gundersen, K. & B. J. Lin - *Diabetes* 14, 805 (1965).
- Gundersen, K. & R. H. Williams - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105, 390 (1960).
- Hales, C. N. & P. J. Randle - *Biochem. J.* 88, 137 (1963).
- Hall, K. - *Acta Endocrinol. (Kbh.)* 70, Suppl. 163 (1972).
- Hechter, O., R. Levine & S. Soskin - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 46, 390 (1941).
- Heding, L. G. - *Proceedings of the Conference on Problems connected with the Preparation and Use of labelled Proteins in Tracer Studies, 1966*, p. 345.
- Hemmingsen, A. M. & A. Krogh, in *The biological standardization of insulin including reports on the preparation of the international standard and the definition of the unit*, p. 40 (1926). (Publication of the League of Nations III, Health, III. 7, C. H. 398) League of Nations Health Organisation, Geneva.
- Herbert, V., K.-S. Lau, C. W. Gottlieb & S. J. Bleicher - *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 1375 (1965).
- Hoffman, W. S. - *J. Biol. Chem.* 120, 51 (1937).
- Houssay, B. A. & M. A. Magenta - *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 92, 822 (1925).
- Humbel, R. E. - *Experientia* 15, 256 (1959).
- Hunter, W. M. & F. C. Greenwood - *Nature* 194, 495 (1962).
- Ide, T., T. Kuzuya, H. Kajinuma, Y. Kanazawa & K. Kosaka - *Diabetes* 18, 65 (1969).

- Izzo, J. L., A. Roncone, M. J. Izzo & W. F. Bale - J. Biol. Chem. 239, 3749 (1964).
- Jakob, A., Ch. Hauri & E. R. Froesch - J. Clin. Invest. 47, 2678 (1968).
- Kajinuma, H., T. Ide, T. Kuzuya & K. Kosaka - Diabetes 18, 75 (1969).
- Kallee, E. - Z. Naturforsch. 7b, 661 (1952).
- Kallee, E. - in Zahnd, G. R. & J. J. Scheidegger - Helv. Med. Acta 30, 506 (1963).
- Kamminga, C. E., A. F. Willebrands, J. R. Blickman & J. Groen - Ned. Tijdschr. Geneesk. 94, 3541 (1950).
- Karam, J. H., G. M. Grodsky & P. H. Forsham - Diabetes 12, 197 (1963).
- Keehan, M. F., M. J. Smith, S. M. Howard, J. W. Mehl & P. M. Beigelman - Clin. Chim. Acta 16, 215 (1967).
- Kelly, J. D. C. - Lancet I, 668 (1956).
- Kipnis, D. M. & M. F. Stein, in The Aetiology of Diabetes Mellitus and its Complications. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, vol. 15, p. 156. Ed. M. P. Cameron and M. O' Connor. London: J. & A. Churchill 1964.
- Konijnendijk, W. & D. W. Smits - Techn. Mitt. AEG-Telefunken, 2. Beih. Datenverarb. 10 (1968).
- Kopetz, K., H. Bürgi, E. R. Froesch & K. Schwarz - Diabetologia 2, 104 (1966).
- Krahl, M. E. - Ann. N. Y. Acad. Sci. 54, 649 (1951).
- Krahl, M. E. & C. R. Park - J. Biol. Chem. 174, 939 (1948).
- Lees, R. S. - J. Lipid Res. 8, 396 (1967).
- Lenti, G., A. Pellegrini, G. Pagano, P. Zizi, R. Cirillo & V. Mascia - Diabetes 17, 489 (1968).
- Leonards, J. R. - Fed. Proc. 18, 272 (1959).
- Leonards, J. R., R. R. Landau & G. Bartsch - J. Lab. Clin. Med. 60, 552 (1962).
- Lerman, J. - Am. J. Med. Sci. 207, 354 (1944).
- Lever, W. F., F. R. N. Gurd, E. Uroma, R. K. Brown, B. A. Barnes, K. Schmid & E. L. Schultz - J. Clin. Invest. 30, 99 (1951).
- Levy, R. I. & D. S. Fredrickson - J. Clin. Invest. 44, 426 (1965).
- Lewis, J. H. - J. A. M. A. 108, 1336 (1937).
- Lockwood, D. H. & T. E. Prout - Clin. Res. 10, 401 (1962).
- Lowell, F. C. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 50, 167 (1942).
- Lowell, F. C. - J. Clin. Invest. 23, 233 (1944).
- Lyngsøe, J. - Acta Med. Scand. 174, 589 (1963).
- Madison, L. L., B. Combes, R. H. Unger & N. Kaplan - Ann. N. Y. Acad. Sci. 74, 548 (1959).
- Maingay, D. - Academisch Proefschrift, Amsterdam 1964.
- Marks, H. P. - Br. Med. J. II, 102 (1925).

- Martin, D. B., A.E. Renold & Y.M. Dagenais - *Lancet* II, 76 (1958).
- Meade, R. C., J.S. Brush & H.M. Klitgaard - *Diabetes* 17, 369 (1968).
- Meade, R. C. & H.M. Klitgaard - *J. Nucl. Med.* 3, 407 (1962).
- Merimee, T. J., D. H. Lockwood & T.E. Prout - *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 116, 191 (1965).
- Mitchell, M. L. & J. Byron - *Diabetes* 16, 656 (1967).
- Moloney, P. J., in *Immunoassay of Hormones*. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, vol. 14, p.182. Ed. G.E.W. Wolstenholme & M.P. Cameron. London: J. & A. Churchill 1962.
- Moloney, P. J. & M. Coval - *Biochem. J.* 59, 179 (1955).
- Morgan, C. R. & A. Lazarow - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 110, 29 (1962).
- Morgan, C. R. & A. Lazarow - *Diabetes* 12, 115 (1963).
- Morgan, C. R., R. L. Sorenson & A. Lazarow - *Diabetes* 13, 1 (1964).
- Mortimore, G. E., F. Tietze & D. Stetten - *Diabetes* 8, 307 (1959).
- Müller, H., N. Kleine, W. Kaufmann & R. Kluthe - *Klin. Wochenschr.* 48, 1276 (1970).
- Páv, J., Z. Jezková & F. Skhra - *Lancet* II, 221 (1963).
- Penchev, I., D. Andreev & S. Ditzov - *Diabetologia* 4, 164 (1968).
- Perley, M. & D. M. Kipnis - *Diabetes* 15, 867 (1966).
- Perry, M. C., W. Tampion & J. A. Lucy - *Biochem. J.* 125, 179 (1971).
- Poffenbarger, P. L., J. W. Ensink, D. K. Hepp & R. H. Williams - *J. Clin. Invest.* 47, 301 (1968).
- Porath, J. & P. Flodin - *Nature* 183, 1657 (1959).
- Prout, T. E., V. V. Odak, G. J. Dendrinis & D. H. Lockwood - *Diabetes*, 12, 144 (1963).
- Rabinowitz, D. & K. L. Zierler - *J. Clin. Invest.* 41, 2173 (1962).
- Rafaelsen, O. J. - *Acta Physiol. Scand.* 61, 314 (1964).
- Rafaelsen, O. J., V. Lauris & A. E. Renold - *Diabetes* 14, 19 (1965).
- Randle, P. J. - *Br. Med. J.* I, 1237 (1954).
- Randle, P. J. - *J. Endocrinol.* 14, 82 (1956).
- Randle, P. J. & K. W. Taylor - *Lancet* II, 996 (1958).
- Renold, A. E., A. Marble & D. W. Fawcett - *Endocrinology* 46, 55 (1950).
- Renold, A. E., D. B. Martin, Y. M. Dagenais, J. Steinke, R. J. Nickerson & M. C. Sheps - *J. Clin. Invest.* 39, 1487 (1960).
- Renold, A. E., J. S. Soeldner & J. Steinke, in *The Aetiology of Diabetes Mellitus and its Complications*. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, vol. 15, p.122. Ed. M. P. Cameron & M. O'Connor. London: J. & A. Churchill 1964.

- Renold, A.E., A.I. Winegrad & D.B. Martin - *Helv. Med. Acta* 24, 322 (1957).
- Rodbell, M. - *J. Biol. Chem.* 239, 375 (1964).
- Roth, J., P. Gordon & I. Pastan - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 138 (1968).
- Salans, L.B., J.L. Knittle & J. Hirsch - *J. Clin. Invest.* 47, 153 (1968).
- Salmon, W.D. & M.R. DuVall - *Endocrinology* 87, 1168 (1970).
- Samaan, N., W.J. Dempster, R. Fraser, N.W. Please & D. Stillman - *J. Endocrinol.* 24, 263 (1962).
- Samaan, N., W.J. Dempster, R. Fraser & D. Stillman - *J. Endocrinol.* 26, 1 (1963).
- Samaan, N., R. Fraser & W.J. Dempster - *Diabetes* 12, 339 (1963a).
- Scanu, A. - *Nature* 207, 528 (1965).
- Schoeffling, K., H. Ditschuneit, R. Petzoldt, J. Beyer, E. Pfeiffer, A. Sirek, H. Geerling & O. V. Sirek - *Diabetes* 14, 658 (1965).
- Schuurs, A.H.W.M., L. van Es & K.W. Pondman - *Immunochem.* 2, 67 (1965).
- Seifter, S., S. Dayton, B. Novic & E. Muntwyler - *Arch. Biochem. Biophys.* 25, 191 (1950).
- Shaw, W.N. & E.W. Shuey - *Biochemistry* 2, 286 (1963).
- Sheps, M.C., R.J. Nickerson, Y.M. Dagenais, J. Steinke, D.B. Martin & A.E. Renold - *J. Clin. Invest.* 39, 1499 (1960).
- Siess, E., A. Teinzer, E. Struck & O. Wieland - *Diabetologia* 1, 21 (1965).
- Slater, J.D.H., N. Samaan, R. Fraser & D. Stillman - *Br. Med. J.* 1, 1712 (1961).
- Smith, L.F. - *Am. J. Med.* 40, 662 (1966).
- Solomon, S.S., P.L. Poffenbarger, D.K. Hepp, L.F. Fenster, J.W. Ensink & R.H. Williams - *Endocrinology* 81, 213 (1967).
- Stadie, W.C. & J.A. Zapp - *J. Biol. Chem.* 170, 55 (1947).
- Stauffacher, W. & A.E. Renold - *Am. J. Physiol.* 216, 98 (1969).
- Stavitsky, A.B. & E.R. Arquilla - *Fed. Proc.* 12, 461 (1953).
- Steelman, S.L., R. Oslapas & R.D. Busch - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105, 595 (1960).
- Steiner, D.F., O. Hallund, A. Rubenstein, S. Cho & C. Bayliss - *Diabetes* 18, 725 (1968).
- Steinke, J., A. Sirek, V. Lauris, F.D. Lukens & A.E. Renold - *J. Clin. Invest.* 41, 1699 (1962).
- Steinke, J. & J.S. Soeldner - Fifth Congress of the International Diabetes Federation, Toronto 1964. *Excerpta Medica Internat. Congress Series No. 84*, p. 212.
- Stern, J.S., H.N. Antoniadis, C.A. Baile & J. Mayer - *Endocrinology* 85, 976 (1969).

- Takane, R. - Biochem. Ztschr. 171, 403 (1926).
- Taylor, K. W. & P. J. Randle - J. Endocrinol. 19, 221 (1959).
- Tuerkischer, E. & E. Wertheimer - Biochem. J. 42, 603 (1948).
- Umbreit, W. W., R. H. Burris & J. F. Stauffer - Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism. Minneapolis: Burgess 1957, p. 149.
- Underwood, L. E., R. L. Hintz, S. J. Voina & J. J. Van Wyk - Clin. Res. 20, 74 (1972).
- Vallance-Owen, J. & B. Hurlock - Lancet I, 68 (1954).
- Vallance-Owen, J., B. Hurlock & N. W. Please - Lancet II, 583 (1955).
- Vallance-Owen, J. & F. D. W. Lukens - Endocrinology 60, 625 (1957).
- Vargas, L., K. W. Taylor & P. J. Randle - Biochem. J. 77, 43 (1960).
- Wasserman, P., R. H. Broh-Kahn & I. A. Mirsky - J. Immunol. 38, 213 (1940).
- Wertheimer, E. - J. Physiol. (Lond.) 103, 359 (1945).
- Wide, L. & J. Porath - Biochim. Biophys. Acta 130, 257 (1966).
- Willebrands, A. F. & J. Groen - Diabetes 5, 378 (1956).
- Willebrands, A. F., J. Groen, C. E. Kamminga & J. R. Blickman - Science 112, 277 (1950).
- Willebrands, A. F., C. E. Kamminga, J. Groen, J. R. Blickman & B. K. Tjiong - Chem. Weekblad 47, 888 (1951).
- Winegrad, A. I. & A. E. Renold - J. Biol. Chem. 233, 267 (1958).
- Wright, P. H. - Lancet II, 621 (1957).
- Wright, P. H. - Biochem. J. 71, 633 (1959).
- Yalow, R. S. & S. A. Berson - Radiology 66, 106 (1956).
- Yalow, R. S. & S. A. Berson - Nature 184, 1648 (1959).
- Yalow, R. S. & S. A. Berson - J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960).
- Yalow, R. S. & S. A. Berson - Am. J. Med. 31, 882 (1961).
- Yalow, R. S. & S. A. Berson - Sixth Congress of the International Diabetes Federation, Stockholm 1967. Excerpta Medica Internat. Congress Series No. 172, p. 233.
- Yalow, R. S., S. M. Glick, J. Roth & S. A. Berson - Ann. N. Y. Acad. Sci. 131, 357 (1965).
- Young, D. A. B. - Diabetologia 3, 287 (1967).
- Zahnd, G. R. & J. J. Scheidegger - Helv. Med. Acta 30, 506 (1963).
- Zoeten, L. W. de & R. van Strik - Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 80, 927 (1961).

Lijst van gebruikte afkortingen

AS	Antiserum
B	Aan antiserum gebonden [^{131}I]insuline
Ci	Curie
cpm	Scintillaties per minuut
F	Vrij, niet aan antiserum gebonden [^{131}I]insuline
ILA	Insuline-achtige activiteit
IRI	Immunoreactief insuline
IRM	Immunoreactief materiaal
SDS	Natriumdodecylsulfaat
TCA	Trichloorazijnzuur

